



# Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon*: étude particulière de *S. Halei* Lamb et *S. montagneanum* Lamb, deux lichens recoltés en Indonésie

Friardi Ismed

## ► To cite this version:

Friardi Ismed. Phytochimie de lichens du genre *Stereocaulon*: étude particulière de *S. Halei* Lamb et *S. montagneanum* Lamb, deux lichens recoltés en Indonésie. Sciences pharmaceutiques. Université Rennes 1, 2012. Français. NNT: 2012REN1S053 . tel-00737382

**HAL Id: tel-00737382**

**<https://theses.hal.science/tel-00737382>**

Submitted on 1 Oct 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*sous le sceau de l'Université Européenne de Bretagne*

pour le grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1**  
*Mention : Chimie*

**Ecole doctorale Sciences De La Matière**

présentée par

**Friardi Ismed**

Préparée dans l'unité de recherche UMR CNRS 6226  
Equipe PNSCM (Produits Naturels Synthèses Chimie Médicinale)  
(Faculté de Pharmacie, Université de Rennes1)

---

**Phytochimie de  
lichens du genre  
*Stereocaulon*: étude  
particulière de  
*S. halei* Lamb et *S.  
montagneanum*  
Lamb, deux lichens  
recoltés en  
Indonésie**

**Thèse soutenue à Rennes  
le 12 Juillet 2012**

devant le jury composé de :

**Nathalie BOURGOUGNON**

Professeur à l'Université de Bretagne-Sud/  
*rapporteur*

**Elisabeth SEGUIN**

Professeur à l'Université de Rouen / *rapporteur*

**Damien ERTZ**

Professeur à le Jardin Botanique National de  
Belgique/ *examineur*

**Amri BAKHTIAR**

Professeur à l'Université de Andalas / *co-directeur  
de thèse*

**Françoise LOHEZIC-LE DEVEHAT**

Maître de conférences à l'Université de Rennes1 /  
*co-directeur de thèse*

**Joël BOUSTIE**

Professeur à l'Université de Rennes 1 / *directeur de  
thèse*



## Remerciements

Je remercie sincèrement en particulier Françoise Lohézic Le-Dévéhat tant pour son implication, sa disponibilité et ses encouragements tout au long de ces trois ans et demi de travail, que pour sa sympathie et sa bonne humeur. Je remercie bien également le professeur Joël Boustie, mon directeur de thèse, pour m'avoir fait confiance, m'avoir guidé, encouragé et conseillé tout au long de mon travail de thèse. Je suis heureux d'avoir pu mener ce travail de thèse au sein de son laboratoire et espère pouvoir y revenir quand l'occasion se présentera.

Je n'oublie pas de remercier le Pr Amri Bakhtiar qui a apporté son soutien, conseils et encouragements dans l'exécution de cette thèse.

Je tiens à remercier le Pr Nathalie Bougougnon de l'Université de Bretagne-Sud et Pr Elisabeth Seguin de l'Université de Rouen pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Leurs remarques et suggestions sont les bienvenues ainsi que celles du Pr Damien Ertz, lichénologue au Jardin National de Belgique dont la participation à mon jury de thèse est aussi un honneur.

Je remercie toute l'équipe PNSCM qui m'a soutenu, qui a écouté mes demandes, donné des idées et des suggestions, de sorte que le manuscrit peut être complété. Merci à Sophie, Marylène, Béatrice, Aurélie, Isabelle, David, Maryse, Philippe, Pierre, Michèle, Nicolas, Jacques, Myriam, Mickaël, Jeff, Jean-Charles. La disponibilité et l'aide d'Audrey Chambet pour l'accès aux documents et échantillons de la collection des Abbayes est aussi à souligner. Je remercie également Nina Corlay et Thi Hang Dao, les deux étudiants master 2 dont l'aide dans le travail de criblage m'a été très précieuse.

J'inclus à mes remerciements tous les étudiants, doctorants et post-doctorants qui ont arpenté les couloirs du laboratoire, que ce soit pour un mois ou plus, et avec qui j'ai passé d'agréables moments : Adrian, Marie, Anne, Sarah Boni, Sandy, Catherine, Sarah Khomaty, Chan, Delphine, Huyen, Tram, Maiwen, Maud, Sabine, Saleem et Adèle.

Je n'oublie pas de remercier les membres de Sumatra du biote laboratoire de l'Université d'Andalas qui m'a donné l'opportunité d'y travailler même pour un court laps de temps. Merci au Prof Dayar Arbain et le Prof Deddi Putra Prima de toujours me donner des conseils, pour leur enthousiasme et leurs encouragements. Je remercie Mlle Nova Syafni, qui a contribué à l'échantillonnage des lichens, ainsi que les « frères de la nature aventureuse »; Taufik, Arya, Hendra, Riki, Remon, Widia et Hary



Je remercie vivement Le Dr Harrie Sipman, conservateur au Museum de Berlin qui a apporté son expertise pour l'identification de nos échantillons de lichens ainsi que d'autres lichénologues comme le Dr Olivier Bricaud ou le Pr Martin Grube. La collaboration avec le Dr Annie Guiller (UMR CNRS 6553 Ecobio- Equipe SCA, Université Rennes 1) a été déterminante pour la réalisation des analyses de biologie moléculaire dans le cadre de l'étude de phylogénie. Le docteur Olivier Delalande (UMR 6026 Interactions Cellulaires et Moléculaires, Université de Rennes 1) qui a aidé à analyser la simulation en dynamique moléculaire (DM). Le docteur Eva-Maria Pferschy-Wenzig et le professeur Rudi Bauer, qui ont effectué des analyses de LC-MS au sein de leur laboratoire en Autriche avec la collaboration du docteur Rechberger ont aussi apporté une aide précieuse. De même, la contribution du Dr Olivier Grovel qui a réalisé des analyses HPLC MS au sein du laboratoire MMS de Nantes (Pr Pouchus) a été très appréciable. Je remercie également Nicolas Le Yondre, Fabian Lambert et Philippe Jéhan du CRMPO, pour leur accueil et leurs conseils avisés concernant l'interprétation des spectres de masse. De la même façon, je remercie Sourisak Sinhbandhit pour son aide et ses explications dans l'interprétation des spectres RMN. Je remercie aussi pour Le Dr Arnaud Bondon (PRISM, Université de Rennes 1) pour nous avoir permis de réaliser des spectres RMN. Je tiens à remercier Monsieur Le Lannic du CMEBA de l'Université de Rennes 1, qui a aidé à analyser au microscope électronique à balayage (MEB)

Je remercie le gouvernement français pour l'octroi d'une aide dans le cadre du programme Bioasia Asilic et notamment l'attaché scientifique à l'Ambassade de France à Djakarta, Mr Dubois, puis Mr Lebail qui ont pris en charge une bourse de 18 mois, ce qui avec des compléments de l'Université de Rennes1 et du laboratoire du professeur Boustie a permis de mener à bien ce travail réalisé dans le cadre d'une direction en co-tutelle.

Enfin, je remercie toute ma famille pour leur présence et leur soutien moral. Je tiens à remercier mes parents et mon frère pour avoir cru en moi et d'être fier de moi. Leur amour inconditionnel et le soutien m'a donné la force et le courage alors que je suis loin de chez eux. Plus important encore, je tiens à remercier ma femme El Shinta Betria, pour être le témoin le plus patient et de soutien à mon parcours académique au cours des trois et demi années. Sans son soutien, d'amour et d'encouragement, cette étude n'aurait pas été possible. Je remercie particulièrement mon petit garçon, Iqbal, pour avoir toujours su me faire sourire dans les moments difficiles. Enfin merci à tous ceux qui liront cette thèse pour l'intérêt qu'ils porteront à mon travail...

# Table des Matières

Remerciements .....	3
Liste des Tables et Figures .....	11
Abréviations .....	15
INTRODUCTION.....	21
Présentation sommaire des lichens, de leurs métabolites et du cadre de l'étude. ....	25
PARTIE 1 .....	45
Criblage de quelques espèces de <i>Stereocaulon</i> .....	45
1 Généralités sur le genre <i>Stereocaulon</i> .....	47
2 Etude préalable des 9 espèces de <i>Stereocaulon</i> récoltées .....	50
2.1 Etude botanique .....	52
2.1.1 Observation macroscopique .....	52
2.1.2 Observation microscopique .....	58
2.2 Discussion - Conclusion .....	64
3 Etude phylogénétique .....	68
3.1 Mode opératoire .....	68
3.2 Résultats .....	69
3.3 Discussion .....	70
4 Etude chimique (analyses et caractérisations).....	73
4.1 Par les réactions thallines .....	73
4.2 Préparation des extraits à partir des thalles de stéréocaulons .....	74
4.2.1 Extraction aqueuse .....	74
4.2.2 Extraction méthanolique .....	76
4.3 Analyses par HPTLC-UV .....	77
4.3.1 Extraits aqueux .....	77
4.3.2 Extraits méthanoliques .....	79
4.4 Analyses par HPLC-DAD.....	83
4.4.1 Extraits aqueux .....	83
4.4.2 Extraits méthanoliques .....	84
4.5 Analyses par HPLC-MS .....	86
4.5.1 Extraits aqueux .....	86
4.5.2 Extraits méthanoliques .....	87
4.6 Discussion - conclusion .....	90

5	Discussion – approche de l’analyse croisée des résultats .....	92
PARTIE 2 .....		101
Etudes phytochimiques .....		101
1	Etude phytochimique de <i>Stereocaulon halei</i> Lamb .....	103
1.1	Extraction.....	103
1.2	Purification.....	104
1.3	Métabolites isolés.....	106
1.3.1	Depside et composés monoaromatiques phénoliques .....	107
1.3.2	Depsidone Sh4 et diphényléther Sh5 (l’acide lobarique et l’acide lobariol carboxylique).....	108
1.3.3	Discussion sur les composés isolés de <i>S. halei</i> .....	116
2	Etude phytochimique des fractions organiques de <i>Stereocaulon montagneanum</i> Lamb. 117	
2.1	Extraction.....	117
2.2	Purification.....	118
2.3	Métabolites isolés.....	121
2.3.1	Atranorine et composés apparentés .....	121
2.3.2	Les depsidones .....	122
2.4	Discussion concernant les métabolites isolés de <i>S. montagneanum</i> .....	128
3	Etude phytochimique des fractions aqueuses de <i>Stereocaulon montagneanum</i> Lamb. 129	
3.1	Recherche de la localisation préférentielle des mycosporines dans le lichen <i>Stereocaulon</i> .....	129
3.1.1	Préparation des échantillons.....	129
3.1.2	Extraction – Purification .....	130
3.1.3	Analyse qualitative des extraits par HPLC-MS .....	131
3.2	Extraction quantitative et purification à partir de <i>S. montagneanum</i> .....	134
3.2.1	Eléments d’identification de Sma1 et Sma 3 .....	136
3.3.	Discussion-Conclusion .....	140
PARTIE 3 .....		145
Evaluation de l’activité photoprotectrice des métabolites isolés.....		145
1	Evaluation comme filtre organique solaire .....	148
1.1	Les caractéristiques d’un bon écran solaire .....	149
1.2	Détermination des constantes caractéristiques d’un écran solaire .....	150

2	Evaluation de l'activité antioxydante .....	152
2.1	Les tests disponibles .....	153
2.2	Résultats .....	153
3	Etude de la cytotoxicité des produits isolés .....	156
4	Evaluation des composés sur la mélanogénèse .....	157
4.1	Principe du test pratiqué.....	158
4.2	Détermination de la Dose Maximale Non Toxique .....	158
4.3	Evaluation sur la mélanogénèse .....	160
5	Conclusion.....	163
	Discussion et conclusion .....	167
	Partie expérimentale.....	173
1	Méthodes de séparation .....	175
1.1	Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative .....	175
1.2	Chromatographie sur colonne ouverte .....	175
1.3	Chromatographie sur colonne sous pression : chromatographie flash.....	175
1.4	Chromatographie circulaire centrifuge: Chromatotron®.....	175
1.5	Chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative et préparative .....	175
2	Appareillages et techniques d'analyse .....	176
2.1	Microscopie.....	176
2.1.1	Microscopie optique .....	176
2.1.2	Microscopie électronique à balayage .....	176
2.1.2.1	Prélèvement .....	177
2.1.2.2	1 <sup>ère</sup> fixation.....	177
2.1.2.3	Déshydratation.....	177
2.1.2.4	Séchage – montage – métallisation .....	177
2.2	Réactions thallines .....	179
2.3	Chromatographie sur couche mince (CCM) .....	180
2.4	Chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC) .....	180
2.5	Chromatographie liquide haute performances (HPLC) avec détecteur à barrettes de diodes (DAD) .....	180
2.6	Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN).....	181
2.7	Spectrophotométrie Ultra-Violet (UV) .....	181
2.8	Spectrométrie de masse (MS) .....	182

2.9	Spectrométrie Infra-Rouge (IR)	182
2.10	Point de fusion (PF)	183
2.11	Pouvoir rotatoire	183
2.12	Modélisation moléculaire	183
3	Criblage des différentes espèces de <i>Stereocaulon</i>	183
3.1	Lichens récoltés	183
3.2	Préparation des extraits	184
3.2.1	Extraits aqueux	184
3.2.1.1	Purification	185
3.2.1.2	Préparation de l'extrait	185
3.2.2	Extraits méthanoliques	186
3.3	HPTLC-UV	186
3.3.1	Extraits aqueux	187
3.3.2	Extraits méthanoliques	187
3.4	HPLC-DAD	187
3.4.1	Extraits aqueux	187
3.4.2	Extraits méthanoliques	188
3.5	HPLC-DAD-MS	188
3.5.1	Extraits aqueux	188
3.5.2	Extraits méthanoliques	189
3.6	Etude phylogénétique	190
3.6.1	Extraction et amplification de l'ADN	191
3.6.2	Analyse des données	192
4	Etude phytochimique de <i>Stereocaulon halei</i>	193
4.1	Récolte de lichen	193
4.1.1	Extraction	193
4.1.2	Séparation et purification des extraits	194
4.1.2.1	Purification de l'extrait n-hexane	194
4.1.2.2	Purification de l'extrait EtOAc	196
5	Etude phytochimique de <i>S. montagneanum</i>	198
5.1	Récolte de lichen	198
5.2	Extraction	198
5.3	Séparation et purification des extraits	199

5.3.1	Purification de l'extrait n-hexane .....	199
5.3.2	Purification de l'extrait Acétone .....	201
5.3.3	Purification de l'extrait MeOH .....	202
5.4	Purification des fractions aqueuses .....	203
6	Evaluation biologique des composés isolés .....	206
6.1	En tant que filtre solaire .....	206
6.1.1	Détermination du spectre UV .....	206
6.1.2	Méthode de détermination du de l'UV PF, de l'UVA PF, du ratio UV PF / UVA PF, du $\lambda_c$ .....	206
6.1.2.1	Préparation de l'émulsion .....	206
6.1.2.2	Préparation de l'échantillon et calculs .....	206
6.2	En tant qu'antioxydant .....	208
6.2.1	Test au DPPH .....	208
6.2.2	Test de piégeage des anions superoxydes .....	208
6.3	En tant qu'agent impliqué dans la mélanogénèse .....	209
6.3.1	Evaluation de la cytotoxicité des composés .....	209
6.3.2	Evaluation de l'activité sur la voie de la mélanogénèse .....	211
7	Description des molécules isolées .....	215
References .....		259
Annexe 1. Liste des espèces de lichens prélevés en Indonésie .....		269
Annexe 2. Liste des 11 herbiers en Indonésie .....		271
Annexe 3. Bibliographie du genre <i>Stereocaulon</i> .....		272
Annexe 4. La classification du genre <i>Stereocaulon</i> .....		281



# Liste des Tables et Figures

Figure 1. Coupe transversale montrant le cortex, moelle, les cellules algales .....	26
Figure 2. Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens .....	27
Figure 3. Structure de l'ergostérol (stéroïde) et de la zéaxanthine (caroténoïde) .....	28
Figure 4. Structure de l'acide vulpinique et de la calycine .....	28
Figure 5 Les probables filiations menant aux grands groupes de métabolites licheniques. ....	29
Figure 6. Structures de l'acide lichestérinique , de l'acide rocellique et de l'acide rangiformique. ....	30
Figure 7. Trois possibilités de cyclisation de l'acide 3,5,7-trioxooctanoïque conduisant à la formation de l'acide orsellinique (1), de l'acide $\beta$ -orsellinique (2) et de la méthylephloroacétophénone (3). ....	30
Figure 8. Structure d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide gyrophorique).....	31
Figure 9. Structure d'une depsidone (acide virensique) et d'une depstone (acide picrolichénique). ....	32
Figure 11 Structure de l'acide usnique (+) et de dérivés dibenzofuranes .....	33
Figure 12. Voie de biosynthèse de l'acide usnique proposée par Taguchi et al., 1969 .....	33
Figure 10. Schéma biogénétique avec la buelline comme un intermédiaire vers le buellolide .....	33
Figure 13. Carte des pays d'Asie du sud-est.....	34
Figure 14. Zones de protection de la biodiversité en Asie du sud est .....	35
Figure 15. Carte d'Indonésie .....	36
Figure 16. Zones de protection de la biodiversité en Indonésie .....	38
Figure 17. Carte de Sumatra et de Java avec endroits de récolte .....	39
Figure 18. Spécimens de l'herbier des Abbayes .....	40
Figure 19. Genre <i>Usnea</i> trouvée dans les constituants de Jamu Benalu Teh® .....	41
Figure 20. Dasypogalactone et deux dérivés l'acide stictique isolés à partir <i>U. dasypoga</i> et <i>U.</i> <i>articulata</i> .....	42
Figure 21. Sites de récolte des Stéréocaulons ( <i>S. graminosum</i> (A) et <i>S. halei</i> (B)) sur le Mont Singgalang et <i>S. montagneanum</i> sur le plateau Simanau, Solok, l'Ouest de Sumatra, Indonésie) .....	43
Figure 22. Illustration de la morphologie générale d'un Stéréocaulon .....	48
Figure 23. Répartition des composés isolés du genre Stéréocaulon d'après la bibliographie. ....	49
Figure 24. Comparaison de nos échantillons <i>S. halei</i> récoltés (spécimen à gauche) avec ceux de l'herbier de Vezda (spécimen à droite).....	65
Figure 25. Organisation dorsiventrale de la phylloclade radiaire de <i>S. exutum</i> .....	66
Figure 26. Relations phylogénétiques entre les individus des espèces de Stéréocaulons. ....	72
Figure 27. Taux d'extraction obtenus après extraction aqueuse à partir de 100 mg de lichens.....	75
Figure 28. Bilan des masses d'extraits obtenus après les deux extractions méthanoliques successives à partir de 100 mg de départ de lichens au départ.....	76
Figure 29. Allure générale de l'analyse par spectrodensitométrie des 10 extraits aqueux des 9 stéréocaulons .....	78



Figure 30. Absorption spécifique à 310 nm de <i>S. evolutum</i> avec apothécies, <i>S. montagneanum</i> et <i>S. halei</i> .....	79
Figure 31. Analyse par spectrophotodensitométrie des 12 extraits méthanoliques .....	80
Figure 32. Chromatogrammes visibles à 310 nm et spectrogrammes (encadrés couleur) des extraits aqueux de <i>S. halei</i> et <i>S. montagneanum</i> .....	84
Figure 33. Classification des 9 Stéréocaulons selon leur morphologie d'après les critères de Johnson .....	93
Figure 34. Schéma d'extraction de <i>S. halei</i> . Obtention et masse des extraits obtenus .....	104
Figure 35. Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait hexanique de <i>S. halei</i> .....	105
Figure 36. Schéma récapitulatif des purifications et des composés obtenus à partir de l'extrait acétate d'éthyle de <i>S. halei</i> .....	106
Figure 37. Structures des composés isolés à partir des fractions <i>n</i> -hexane et AcOEt.....	107
Figure 38. Structure de l'acide lobarique (Sh4) (à gauche) et de l'acide lobariol carboxylique (Sh5) .....	109
Figure 39. Corrélations C-H pour les protons aromatiques d'après la RMN 2D de l'acide lobarique .....	110
Figure 40. Agrandissement du spectre HMBC (500 MHz; acétone) de Sh4 .....	110
Figure 41. Corrélations C-H pour les protons aromatiques de RMN 2D pour Sh5 .....	112
Figure 42. Expansion de spectres RMN <sup>1</sup> H de Sh5 à différentes températures (en MeOD) .....	112
Figure 43. Modélisation moléculaire réalisée sur l'acide lobariol carboxylique Sh5 .....	113
Figure 44. Relation proposée entre les depsidones (loxodine et norlobaridone) et les éthers de diphenyle (loxodinol et et isonorlobaridone).....	114
Figure 45. Relation biogénétique proposée entre l'acide lobarique (Depsidone) et l'acide lobariol carboxylique (diphényléther) .....	115
Figure 46. Structure du sakisacaulon A isolé à partir <i>Stereocaulon sasakii</i> .....	116
Figure 47. Schéma d'extraction de <i>S. montagneanum</i> . Obtention des extraits .....	118
Figure 48. Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait <i>n</i> -hexane.....	119
Figure 49. Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait acétone .....	120
Figure 50. Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait méthanol .....	120
Figure 51. Structure de l'atranol (Smo3) .....	122
Figure 52. Structure de l'acide stictique et de ses dérivés .....	123
Figure 53. Spectres RMN comparés des dérivés de l'acide stictique (SA= acide stictique, PA= acide péristictique, CSA= acide cryptostictique, MA= acid ménégazziaïque, NSA= acide norstictique et BPA= acide péristictique de butyle).....	125
Figure 54. Corrélations C-H pour les protons aromatiques de RMN 2D pour Smo10 .....	128
Figure 55. Visualisation des différentes parties extraites séparément afin de rechercher les mycosporines dans <i>S. halei</i> (Sh) et <i>S. montagneanum</i> (Sm) .....	130
Figure 56. Structure de la mycosporine glutamicol .....	132
Figure 57. Schéma d'extraction de <i>S. montagneanum</i> visant à obtenir des mycosporines....	134

Figure 58 Schéma récapitulatif des purifications et des composés obtenus à partir de la fraction aqueuse de <i>S. montagneanum</i> (pinf).	135
Figure 59. Spectre UV (200-400 nm) de Sma 1	136
Figure 60. Chromatogramme HPLC-DAD et profil UV des composés contenus dans Sma1	137
Figure 61. Le spectre UV de Sma3	138
Figure 62. Le chromatogramme de HPLC-DAD de composés Sma3	139
Figure 63. Schéma de voies d'échange entre le mycobionte et le cyanobionte chez le lichen tripartite <i>Peltigera aphthosa</i>	140
Figure 64. Schéma simplifié des voies métaboliques chez la cyanobactérie	141
Figure 65. Voie de l'acide shikimique et point de départ de la biogenèse des mycosporines et MAAs	142
Figure 66. Coupe longitudinale de céphalodie de <i>S. montagneanum</i> (coloration au HES de la coupe semi-fine)	143
Figure 67. Visualisation des contacts étroits entre les cyanobactéries et les hyphes du champignon formant les ramifications cartilagineuses du pédicelle (coupe transversale de céphalodie de <i>S. montagneanum</i> – coloration fuschine des coupes semi-fines)	143
Figure 68. Schéma de pénétration des radiations UVA et UVB dans la peau et principaux effets. En rose: effets à court terme; en bleu: effets à long terme	149
Figure 69. Spectres UV de l'atranorine (atr), du MOC (moc), de l'acide stictique (SA) et de l'acide lobarique (LA) qui ont servi au calcul des constantes caractéristiques d'un écran solaire.	151
Figure 70. Pénétration des radiations lumineuses dans la peau	152
Figure 71. Activité antioxydante des composés lichéniques sur les tests DPPH et NBT.	154
Figure 72. Schéma de représentation synoptique des étapes pour la détermination de la mélanogénèse.	158
Figure 73. Courbes exprimant l'activité cytotoxique sur les cellules B16 en fonction d'une concentration croissante des 5 composés lichéniques (test sur 5 jours).	159
Figure 74. Structures de l'acide glycyrrhizique (mélanostimulant), de l'arbutine et de l'hydroquinone (dépigmentants).	161
Figure 75. Activités des composés sur la mélanogénèse : impact sur la synthèse de mélanine et l'activité de l'enzyme tyrosinase	162
Figure 76. Schéma de préparation de la solution échantillon et du blanc pour déterminer les caractéristiques de protecteur solaire.	207
Figure 77. Voie de synthèse des mélanines.	209
Tableau 1. Synonymies des espèces de Stéréocaulons récoltées	51
Tableau 2. Comparaison des caractéristiques morphologiques de <i>S. vesuvianum</i> , <i>S. graminosum</i> , <i>S. vulcani</i>	55
Tableau 3. Comparaison des caractéristiques morphologiques de <i>S. grande</i> , <i>S. evolutum</i> , <i>S. dactylophyllum</i> .	56

Tableau 4. Comparaison des caractéristiques morphologiques de <i>S. halei</i> , <i>S. montagneanum</i> , <i>S. scutelligerum</i> .....	57
Tableau 5. Comparaison des caractéristiques morphologiques de <i>S. vesuvianum</i> , <i>S. graminosum</i> , <i>S. vulcani</i> .....	60
Tableau 6. Comparaison des caractéristiques morphologiques de <i>S. grande</i> , <i>S. evolutum</i> , <i>S. dactylophyllum</i> .....	61
Tableau 7. Comparaison des caractéristiques morphologiques de <i>S. halei</i> , <i>S. montagneanum</i> , <i>S. scutelligerum</i> .....	62
Tableau 8. Observation des céphalodies de <i>S. halei</i> et <i>S. montagneanum</i> au MEB et sur coupes semi-fines .....	63
Tableau 9. Comparaison des critères microscopiques des 9 espèces de Stéréocaulon récoltées .....	67
Tableau 10. Réactions thallines des neuf espèces de Stéréocaulons .....	74
Tableau 11. Récapitulatif des composés présents dans les extraits méthanoliques des 9 Stéréocaulons après analyse HPTLC-UV.....	82
Tableau 12. Composés repérés dans les extraits aqueux par HPLC/UV (en gras, signaux pouvant correspondre à des oxomycosporines).....	83
Tableau 13. Récapitulatif des signaux récurrents retrouvés dans les extraits méthanoliques des 9 stéréocaulons par HPLC-DAD .....	85
Tableau 14. Récapitulatif des composés retrouvés par LC-MS dans les extraits méthanoliques des 9 espèces de Stéréocaulons .....	88
Tableau 15. Récapitulatif des données relatives aux Stéréocaulons étudiés par Hognabba et dans notre étude (en rouge) relativement à leur classification selon Lamb, leurs métabolites majoritaires, et leur localisation géographique. ....	97
Tableau 16. Comparaison des données RMN des dérivés stictiques .....	126
Tableau 17. Taux d'extraction obtenus après extraction aqueuse à partir des différents tissus prélevés .....	131
Tableau 18. Composés de type mycosporine repérés par HPLC-DAD-MS and LC-HRMS dans les les échantillons.....	133
Tableau 19. Valeurs des $\epsilon$ , SPF estimé, UVA-PF estimé, ratio UVA/UVB estimé et $\lambda_c$ estimé pour l'atranorine, le MOC, l'acide stictique, l'acide lobarique et l'acide lobariol carboxylique comparés à 2 filtres UV de référence (Homosalate et Avobenzon).....	151
Tableau 20. Activité cytotoxique (B16 et HaCaT) au bout de 3 jours des produits lichéniques .....	156
Tableau 21. Activité cytotoxique des produits lichéniques sur 5 jours (exprimée en $CI_{50}$ - $\mu M$ ) et détermination de leur Dose Maximale Non Toxique (en $\mu M$ ). ....	160
Tableau 22. Poids des spécimens de lichens recueillis pour réaliser l'étude phylogénétique	192
Tableau 23. Liste des espèces de lichens prélevés en Indonésie.....	269
Tableau 24. Liste des 11 herbiers en Indonésie .....	271
Tableau 25. Les composés lichéniques extraits du genre Stéréocaulon.....	272
Tableau 26. Classifications des <i>Stereocaulon</i> selon Lamb et Duvigneaud.....	284

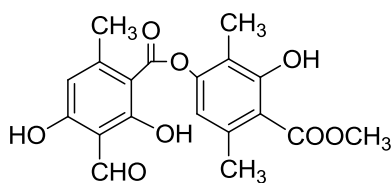
## Abréviations

AAPH	2,2'-azobis(2-amidino-propane) dihydrochloride
ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)
AcOEt	Acétate d'éthyle
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF	Acide Formique
AFL	Association française de Lichénologie
AIC	Akaike Information Criterion (Akaike critère d'information)
AICc	Akaike Information Criterion (Akaike critère d'information) avec correction
ANS	Anisaldéhyde Sulfurique
ARNr	Acide Ribonucléique ribosomique
BIC	Bayesian Information Criterion (Critère d'information bayésien)
CC	Chromatographie sur colonne
CCC	Chromatographie Circulaire Centrifuge
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CI <sub>50</sub>	Concentration Inhibitrice 50%
COSY	Correlation Spectroscopy
DAD	Diode Array Detector
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DPPH	1,1-diphényl-2-picrylhydrazyle
DOPA	Dihydroxyphénylalanine
D <sub>2</sub> O	Eau deutérée
DO	Densité Optique
EE	Ether éthylique
ESI	Electrospray ionisation
HaCaT	Human adult low Calcium Temperature keratinocytes (lignée de kératinocytes humains)
HCl	Acide chlorhydrique
HES	Hématéine Eosine Safran
ITS	Internal Transcribed Spacer (espaceur interne transcrit)
MEB	Microscope Electronique à Balayage
HMBC	Heteronuclear Multiple Bound Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPTLC-UV	High Performance Thin Layer Chromatography-Ultra Violet

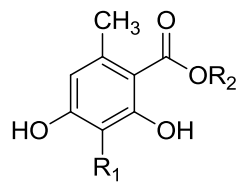
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
IRFT	Infra-rouge à transformée de Fourier
LC-MS	Liquid Chromatography – Mass Spectrometry
MAAs	mycosporine-like amino-acids
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MeOH	Méthanol
MOC	methyl orcinol carboxylate (= carboxylate de méthyle)
NADH	Nicotinamide Adenine Déshydrogénase
NaCl	Chlorure de sodium
NBT	Nitro-bleu de tétrazolium
NCI	National Cancer Institute
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PCR	Polymerase Chain Reaction (réaction en chaîne de polymérase)
Rf	Rapport frontal
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
ShX	Code molecule pour <i>S. halei</i>
SmoX	Code molecule d'organique pour <i>S. montagneanum</i>
SmaX	Code molecule d'aqueux pour <i>S. montagneanum</i>
SPF	Sun Protection Factor
TBE	Tris-Borate-EDTA
TRAP	Total Reactive Antioxidant Potential
UV-PF	Ultra Violet- Protection Factor



## Les produits isolés de *Stereocaulon halei*



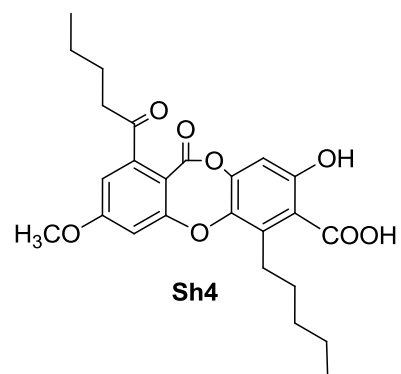
**ShA et ShB**



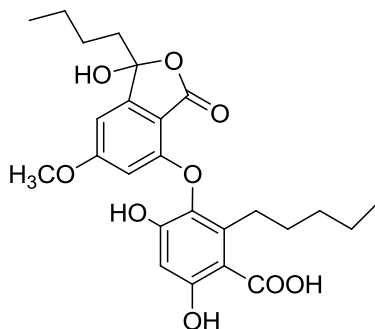
**Sh1**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$

**Sh2**  $R_1 = \text{CHO}$ ,  $R_2 = \text{CH}_3$

**Sh3**  $R_1 = \text{CHO}$ ,  $R_2 = \text{C}_2\text{H}_5$



**Sh4**



**Sh5**

**ShA et ShB** = Atranorine

**Sh1** = Orcinol carboxylate de méthyle (MOC)

**Sh2** = Haematommate de méthyle

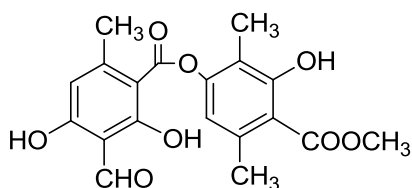
**Sh3** = Haematommate d'éthyle

**Sh4** = Acide lobarique

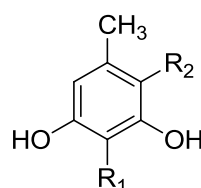
**Sh5** = Acide lobariol carboxylique



## Les produits isolés de *Stereocaulon montagneanum*



**SmoA et SmoB**

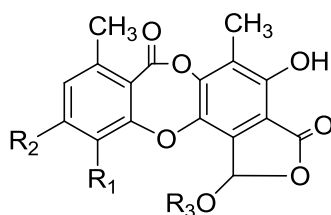


**Smo1**  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{COOCH}_3$

**Smo2**  $R_1 = \text{CHO}$ ,  $R_2 = \text{COOCH}_3$

**Smo3**  $R_1 = \text{CHO}$ ,  $R_2 = \text{COOC}_2\text{H}_5$

**Smo4**  $R_1 = \text{CHO}$ ,  $R_2 = \text{H}$



**SmoC**  $R_1 = \text{CHO}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ ,  $R_3 = \text{H}$

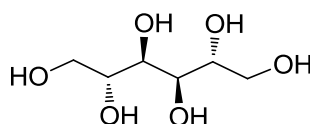
**Smo5**  $R_1 = \text{COOH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ ,  $R_3 = \text{H}$

**Smo6**  $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ ,  $R_3 = \text{H}$

**Smo7**  $R_1 = \text{OH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ ,  $R_3 = \text{H}$

**Smo8**  $R_1 = \text{CHO}$ ,  $R_2 = \text{OH}$ ,  $R_3 = \text{H}$

**Smo10**  $R_1 = \text{COOH}$ ,  $R_2 = \text{OCH}_3$ ,  $R_3 = \text{C}_4\text{H}_9$



**Smo9**

**SmoA et SmoB** = Atranorine

**SmoC** = Acide stictique

**Smo1** = Orcinol carboxylate de méthyle (MOC)

**Smo2** = Haematommate de méthyle

**Smo3** = Haematommate d'éthyle

**Smo4** = Atranol

**Smo5** = Acide périctictique

**Smo6** = Acide cryptostictique

**Smo7** = Acide ménégazziaïque

**Smo8** = Acide norstictique

**Smo9** = Mannitol

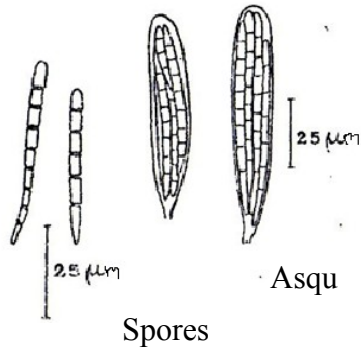
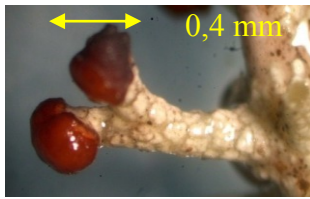
**Smo10** = Acide périctictique de 9'-O-butyle

# Structuration des Stéréocaulons

## (Éléments de diagnose)

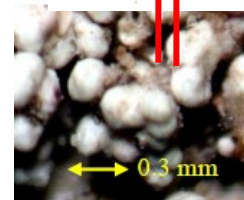
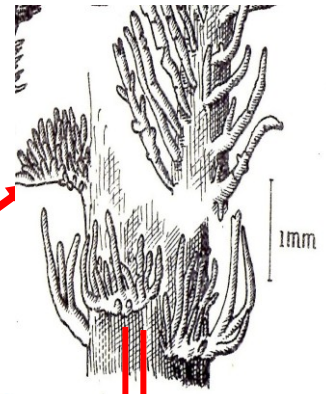
### Apothécie

Organe sexué du champignon souvent en forme de coupe. Au sein de l'apothécie, se trouve l'hyménium contenant les asques, elles-mêmes contenant les spores.

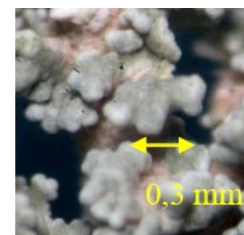


### Phylloclade

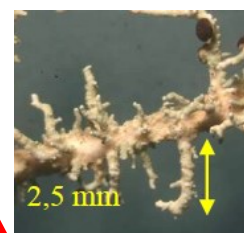
Organite où a lieu la photosynthèse réalisée par le photobionte. Elles peuvent se présenter sous différentes formes comme photographié ci-dessous :



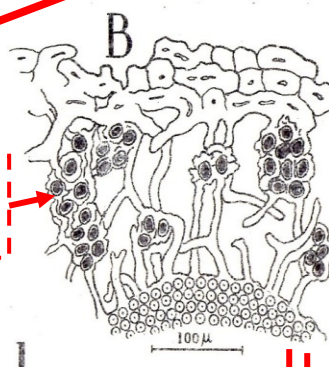
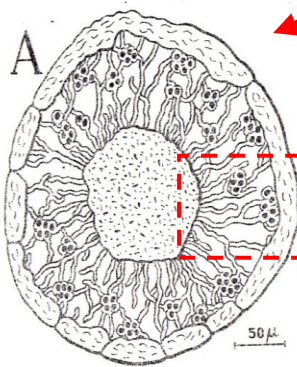
granuliforme



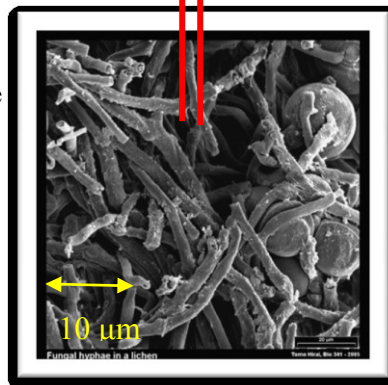
coralloïde



ramuliforme



C



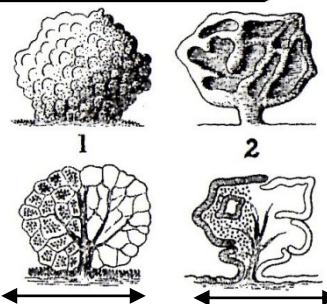
### Pseudopodétion

Thalle érigé dit secondaire provenant de l'élongation du thalle primaire initialement sous forme de granules basales aussi.

A: Coupe transversale

B: Détail du pseudopodétion

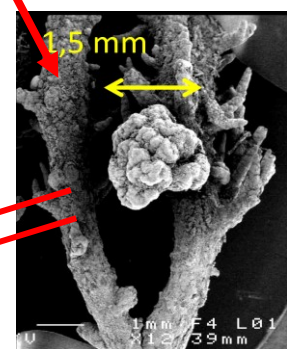
C: Détail de l'enchevêtrement entre l'algue et le champignon (Microscope électronique à balayage)



Les céphalodies peuvent posséder des morphologies différentes. Ci-dessus type sphérique (1) et scrobiculé (2)

### Céphalodies

organite spécial contenant des cyanobactéries capables d'assimiler l'azote atmosphérique



# **INTRODUCTION**





## INTRODUCTION

Les lichens qui sont formés à partir de deux individus distincts, un champignon (mycobionte) et un ou plusieurs partenaires photosynthétiques (photobiontes), correspondent à des organismes symbiotiques. Bien que moins utilisés que les plantes en médecine traditionnelle, ils sont devenus plus récemment des sources potentielles de substances pharmacologiquement actives. Ils se présentent parfois sous forme de thalles dont la biomasse est suffisante pour être collectée et étudiée d'un point de vue phytochimique.

A la faveur d'une collaboration entre le laboratoire de Rennes et celui de Padang qui s'inscrit dans le cadre d'un programme Bioasia intitulé Asilic pour étudier des lichens asiatiques, les recherches ont porté sur des lichens du genre *Stereocaulon*. Ce type de lichen est en effet particulièrement abondant sur des terrains siliceux et volcaniques comme ceux que l'on trouve en Indonésie. Présentes en quantité sur des roches ou le sol, plusieurs espèces ont été récoltées dans des régions montagneuses autour de Padang, île de Sumatra. Compte tenu de la spécialisation du laboratoire de Rennes, les espèces ont été récoltées dans les zones exposées soleil car elles sont supposées contenir des métabolites secondaires qui les protègent contre les effets délétères des rayonnements ultraviolets. (Hidalgo, Fernández et al. 2002).

Si les Stéréocaulons sont largement distribués à travers le monde avec plus d'une centaine d'espèces, ils ont été relativement peu étudiés et ils constituent un groupe de lichens particulièrement difficile pour distinguer entre elles différentes espèces, de sorte que la récolte et l'identification des échantillons est déjà un défi. C'est aussi la raison pour laquelle, nous avons sollicité des spécialistes comme le Dr Harrie Sipman du Muséum de Berlin et que nous avons apporté un soin particulier à avoir différentes approches pour étudier ces espèces : botanique, chimique et analyse en biologie moléculaire. En plus des trois espèces récoltées en Indonésie (*S. graminosum*, *S. halei* et *S. montagneanum*), nous avons eu l'opportunité d'intégrer à ce travail plusieurs espèces en provenance de l'Ile de la Réunion (*S. vulcani* et *S. scutelligerum*) et de diverses régions de France métropolitaine (*S. grande*, *S. dactylophyllum*, *S. evolutum*) ou d'Italie (*S. vesuvianum*).

Un de nos objectifs qui correspond à la première partie de ce travail est de croiser un maximum d'informations et d'observations sur la dizaine d'espèces à notre disposition afin de :

- mettre éventuellement en évidence les critères les plus pertinents pour la taxonomie de ces espèces

- bien identifier les espèces sur lesquelles nous développerions une étude phytochimique plus approfondie
- préparer cette étude phytochimique quantitative par des analyses qualitatives nous orientant sur le type de composés présents (nature chimique et comportement physicochimique).

De plus dans ce cas précis, nous avons pu mener des analyses sur diverses parties des échantillons puisque ceux-ci différencient parfois des tissus spécifiques comme les céphalodies (où les cyanobactéries plutôt que les alques vertes sont associées avec les filaments du champignon)

La deuxième partie du travail correspond à une étude phytochimique visant à isoler et identifier les métabolites produits par deux de ces espèces récoltées en Indonésie *S. halei* Lamb et *S. montagneanum* Lamb. Si la première espèce avait été récoltée au début de ce travail au mont Singgalang (ouest Sumatra), la seconde a été récoltée Plateau Simanau lors du séjour en Indonésie, entre Aout 2009 et mars 2010 où des extraits ont aussi été préparés. Selon Lamb (1977) *S. halei* est censé contenir un depside (l'atranorine), et une depsidone (l'acide lobarique) alors qu'aucune étude chimique n'a véritablement été menée sur *S. montagneanum*. Nous n'avons pas suivi de démarche de bioguidage ni suivi des orientations données par des usages particuliers car peu d'entre eux sont utilisés en médecine traditionnelle. On signalera cependant que *S. paschale* et *S. vulcani* sont signalés pour un usage antihémorragique, le traitement de l'hypertension artérielle, les symptômes du diabète, le traitement des blessures et des ulcères, et le traitement de la syphilis (Hanssen and Schadler 1985; Lavergne 1989; Fraser, Cuerrier et al. 2007). Notre stratégie est plutôt d'isoler ces composés originaux qui ne sont pas disponibles autrement que par extraction et d'évaluer par la suite les activités de ou les propriétés des produits purs en fonction de critères bibliographiques ou physicochimiques rapportés à leur structure.

Le nombre de métabolites lichéniques isolées de plus de 800 dans le travail de référence effectué par Huneck en 1996 (Huneck and Yoshimura 1996) et actuellement le nombre de substances lichéniques identifiées est aux alentours de 1050 (Stocker-Wörgötter 2008) dont une quarantaine pour le genre *Stéréocaulon* (cf tableau en Annexe). Malgré le très bon score d'activité pour les propriétés biologiques de ces composés, le nombre de tests réalisés reste particulièrement limité en fonction d'une disponibilité en molécules lichéniques qui se limite à quelques dizaines de composés seulement (Boustie and Grube 2005).

C'est donc dans une troisième partie nous rapportons les essais physicochimiques et biologiques menés sur les molécules isolées en quantité suffisante dans le cadre d'une valorisation dans le domaine de la photoprotection.

Une discussion reprend les éléments essentiels de ce travail pour mettre en avant l'apport de nos résultats pour la connaissance des ces lichens, l'intérêt des molécules isolées d'un point de vue chimiotaxonomique et biogénétique essentiellement.

Les conditions expérimentales et un récapitulatif des données obtenues pour tous les composés sont positionnés à la fin du document.



## **Présentation sommaire des lichens, de leurs métabolites et du cadre de l'étude.**

### **Que sont les lichens ?**

Les lichens sont des organismes présents dans le monde entier, des tropiques à l'Antarctique en raison de leur capacité à vivre dans un environnement difficile. Cette possibilité est en partie due à la nature symbiotique de l'association d'un champignon appelé mycobionte (du Grec mykes, "champignon" et le bios, "vie") avec un ou plusieurs types d'algues ou de cyanobactéries qui sont alors les photobiontes (photo-, "lumière" et le bios, "vie"). Cette association lui confère une structure spécifique et une reproduction différente comparée à chaque organisme seul. Le champignon a un rôle dominant dans cette relation, y compris pour assurer la reproduction sexuée ; l'observation fine de ces organes de reproduction est souvent indispensable pour préciser le nom et le type de lichen. Environ 98% des champignons lichénisants sont des Ascomycètes (spores enfermées dans des asques), les autres sont des Basidiomycètes. On décrit environ 18500 espèces de champignons lichénisants, ce qui représente presque la moitié de tous les ascomycètes connus (Grube and Hawksworth 2007). Seules 40 genres de photobiontes réalisent la symbiose avec les Ascomycètes et les plus communs sont les algues vertes des genres *Trebouxia* et *Trentepohlia*, et les cyanobactéries du genre *Nostoc* et *Scytonema*. Certains lichens appelés tripartites incorporent deux photobiontes : une algue verte et une cyanobactérie et la morphologie du thalle peut varier en fonction de conditions environnementales favorisant l'expression de l'un ou l'autre des photobiontes (ex : *Sticta canariensis*) (Raven, Evert et al. 2000). Enfin, plusieurs espèces d'un même genre d'algues peuvent servir de photobiontes à une même espèce de lichen.

Extérieurement, le thalle lichénique, appareil végétatif rudimentaire, peut être morphologiquement variable et définit plusieurs types de lichens (Van-Haluwyn, Asta et al. 2009): on trouve des thalles gélatineux (cassants à l'état sec et gélatineux à l'état humide), foliacés, fruticuleux, crustacés (encroutés), squamuleux, lépreux (comme de la poudre) ou complexes. Les thalles complexes sont encore appelés thalles composites car ils sont d'abord formés d'un thalle primaire plus ou moins foliacé ou squamuleux, adhérent au substrat, sur lequel se développe un thalle secondaire dressé, plus ou moins ramifié, ou en forme de trompette (podétion). Dans ce dernier type, deux genres sont fréquemment retrouvés : le genre *Cladonia s.l* et le genre *Stereocaulon* qui se distinguent l'un de l'autre par une structure

creuse des podétions chez les cladonias alors que ceux-ci sont pleins chez les stéréocaulons (fig. 1):

- On visualise aisément par des coupes transversales de ces thalles, l'organisation des hyphes du champignon et les cellules algales.
- Leur disposition détermine un type de structure particulier : si le champignon et l'algue (ou cyanobactéries) sont entremêlés de façon homogène, on parle de thalle homéomère alors que si la structure est stratifiée, on parle de thalle hétéromère. On trouvera alors de la face supérieure à la face inférieure :
  - Un cortex supérieur formé par des cellules jointives du champignon
  - Une couche algale, mélange de cellules algales et d'hyphes lâches mycéliens
  - Une couche médullaire ou médulle formée par des hyphes lâches de champignon
  - Un cortex inférieur, cellules de champignon d'où s'échappent parfois des rhizines qui servent à la fixation du thalle.

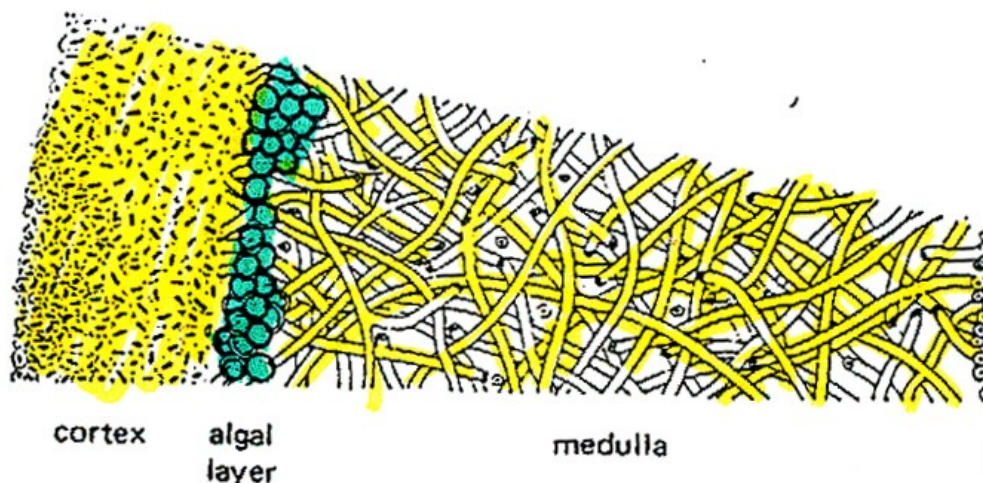


Figure 1. Coupe transversale montrant le cortex, moelle, les cellules algales ([www.msu.edu/course/bot/423/Plntlist8mosslichen.html](http://www.msu.edu/course/bot/423/Plntlist8mosslichen.html)).

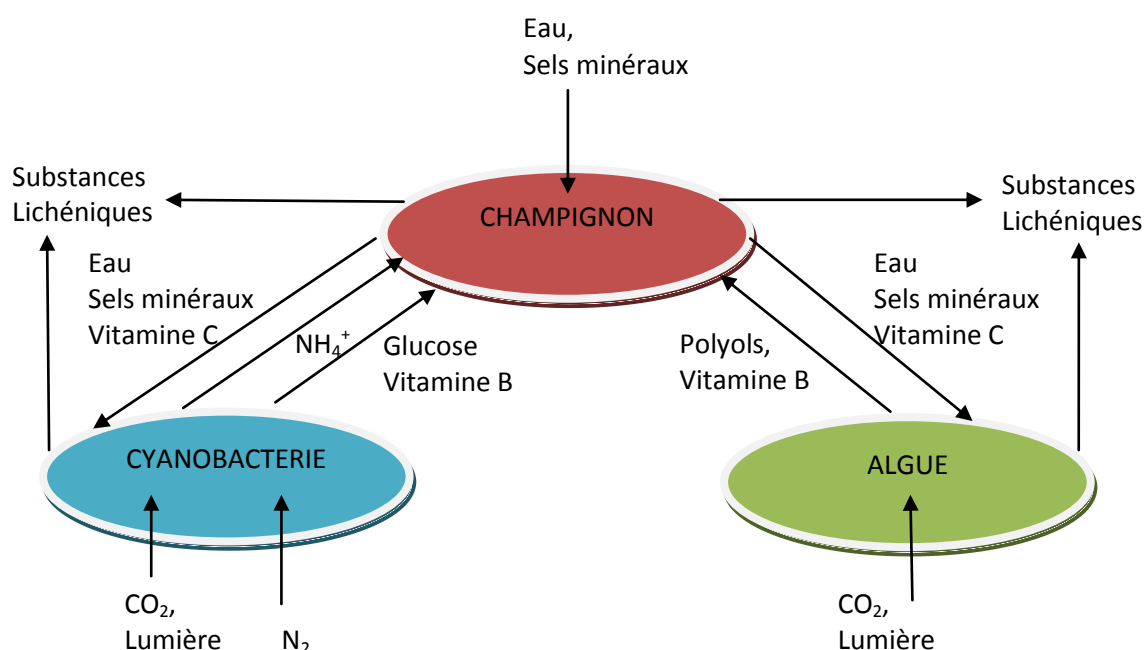
- Chez certains lichens, notamment les fruticuleux (ex. Stéréocaulons), la structure hétéromère est dite radiée, car le thalle cylindrique, montre une symétrie axiale. Il présente depuis la périphérie jusqu'au centre, les mêmes couches que la structure hétéromère stratifiée, mais le cortex inférieur n'existe pas.

### **Les relations métaboliques entre les deux partenaires**

Les lichens sont donc des organismes symbiotiques associant un mycosymbiote et au moins un photosymbiote. Le premier assure la protection physique à l'ensemble, tandis que

le second par la photosynthèse apporte la matière organique carbonée et fait du lichen un organisme autotrophe.

Les algues vertes fabriquent de nombreuses substances nécessaires au champignon, notamment de la vitamine B et des polyols, substances dérivées des sucres. Chez les cyanobactéries, le carbone fixé est plutôt cédé au champignon sous forme de glucose. Polyols et glucose sont ensuite transformés par le champignon en polysaccharides et toute une série de métabolites secondaires. Les cyanobactéries sont aussi capables de fixer l'azote atmosphérique, cédé au champignon sous forme d'ammonium (Van-Haluwyn, Asta et al. 2009)(fig.2).



**Figure 2. Echanges nutritionnels entre les partenaires des lichens (d'après Van-Haluwyn, astra et al. 2009)**

De son côté, le champignon a un rôle de fixation sur le substrat grâce aux rhizines, et un rôle de protection. Il fournit au photosymbiote l'eau et les sels minéraux, des vitamines comme la vitamine C. De plus dans certains cas, il peut vivre en saprophyte en extrayant du milieu des substances organiques, ou en parasite sur un autre lichen. (Van-Haluwyn, Asta et al. 2009).

### **Les voies de biogénèse des métabolites secondaires lichéniques**

Le nombre de métabolites lichéniques isolés dépasse les 800 dans l'ouvrage de référence réalisé par Huneck en 1996 (Huneck and Yoshimura 1996) et actuellement le nombre de substances lichéniques identifiées dépasserait les 1050 (Stocker-Wörgötter 2008).



Asahina et Shibata (Asahina and Shibata 1971) ont été les premiers à proposer la classification des métabolites secondaires issus de lichens sur la base des voies de biosynthèse, précisées par la suite (Culberson and Elix 1989; Elix 1996).

La majeure partie des métabolites secondaires présents dans les lichens est dérivée de la voie de la polycétide synthase (Elix 1996) mais les voies de biogénèse de l'acide shikimique et de l'acide mévalonique sont également présentes (fig.5).

- **La voie du mévalonate** conduit essentiellement à la synthèse de di- et triterpènes, aux stéroïdes et aux caroténoïdes. Tous ces dérivés proviennent de l'assemblage d'unités isopréniques formées à la partir de l'acétylCoA. L'isopentenylpyrophosphate (unité en C5) conduit soit au géranylpyrophosphate (unité en C20), précurseur des diterpènes et des caroténoïdes, soit au squalène (unité en C30), précurseur des stéroïdes et triterpènes. Ces composés ne sont pas spécifiques des lichens et sont très souvent présents.

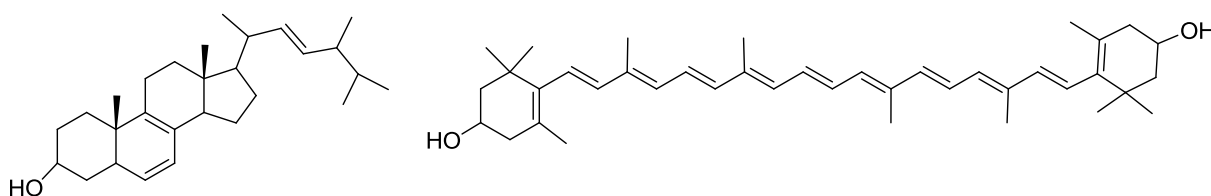


Figure 3. Structure de l'ergostérol (stéroïde) et de la zéaxanthine (caroténoïde)

- **La voie de l'acide shikimique** permet la biosynthèse des acides aminés aromatiques (tyrosine, phénylalanine, tryptophane) eux-mêmes précurseurs de produits naturels intéressants comme l'acide vulpinique et la calycine (fig.4), pigments jaunes, issus des lichens *Letharia vulpina* et *Pseudocyphellaria crocata*. (Maass, Towers et al. 1964; Mosbach 1964; Stocker-Wörgötter 2008).

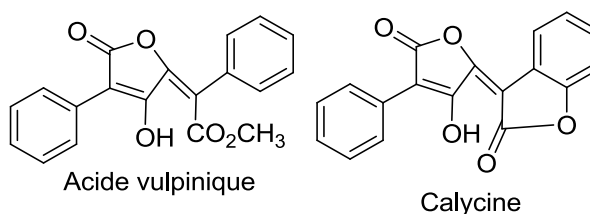
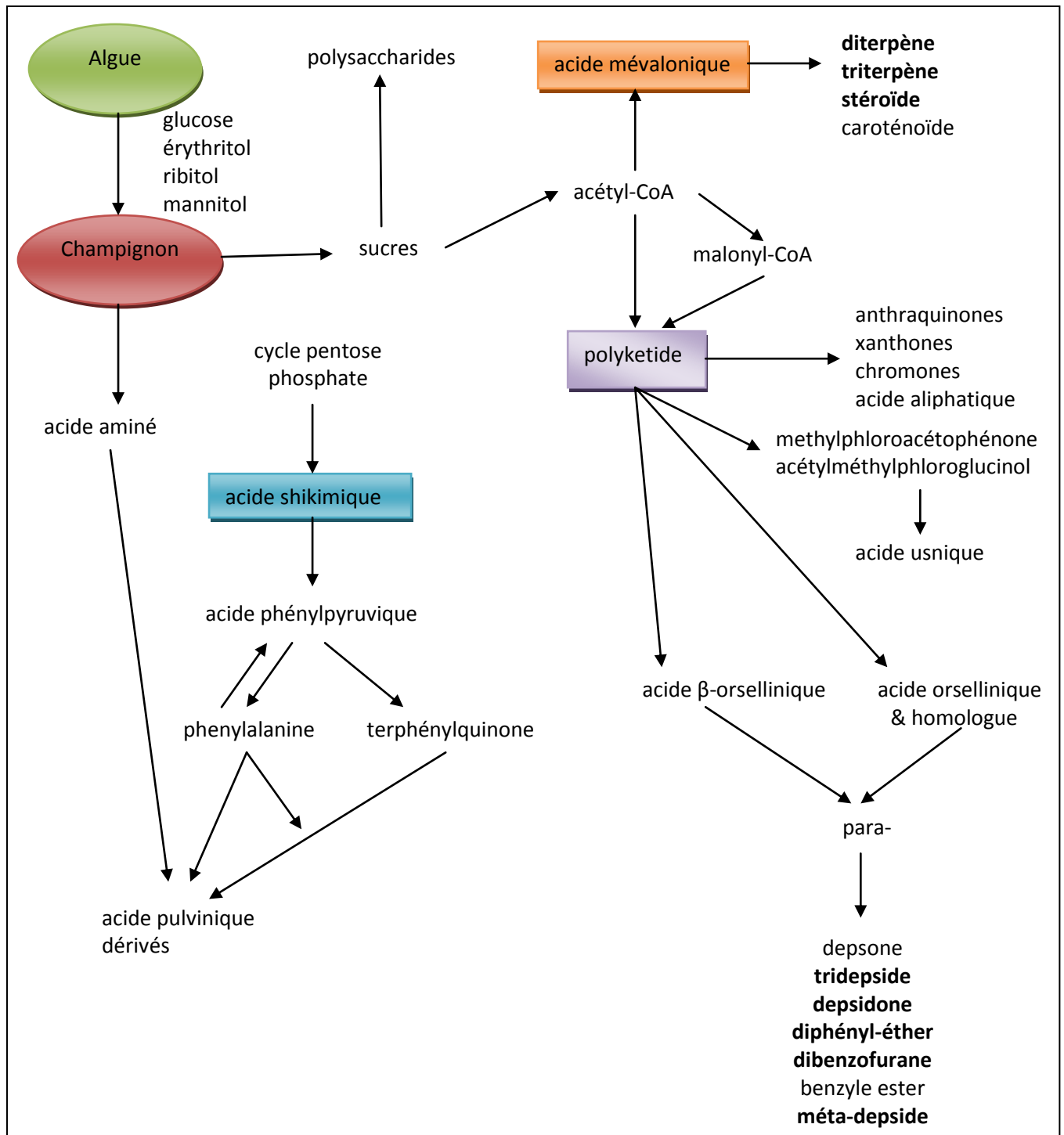


Figure 4. Structure de l'acide vulpinique et de la calycine



**Figure 5** Les probables filiations menant aux grands groupes de métabolites lichéniques. (Adapté de Elix 1996)

En gras figurent les classes de métabolites retrouvées chez les Stéréocaulons

- **La voie de l'acétate polymalonate** permet la biogénèse des dérivés dibenzofuranes, des anthraquinones, xanthones et chromones, des acides aliphatiques et des dérivés de l'acide orsellinique. Cette voie donne des métabolites originaux propres aux lichens. On trouve :

- Les acides aliphatiques qui peuvent être divisés en trois groupes : les  $\gamma$ -lactones (ex : acide lichestérinique), les diacides gras (ex : acide rocellique) et les triacides gras (ex : acide rangiformique) (fig. 6). La formation de ces acides lichéniques résulte de la condensation de type aldolisation d'une longue chaîne alcanoyl-S-CoA avec une unité d'acide cétonique.

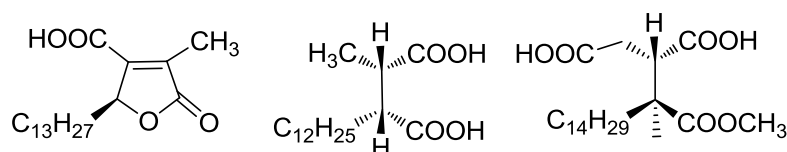


Figure 6. Structures de l'acide lichestérinique , de l'acide rocellique et de l'acide rangiformique.

- Les polyacétates aromatiques ont pour structure de base l'acide orsellinique ou un de ses homologues, qui se condensent sous forme de composés di-, tri- ou tétracycliques. Ces composés sont les structures les plus fréquemment produites par les lichens ; les composés initiaux sont issus de la condensation des unités acétyl-CoA et malonyl-CoA correspondant à la formation d'une chaîne en C-8 qui, par condensation de type aldolisation interne ou condensation de Claisen, conduit aux 3 types de composés décrits dans la figure 7.

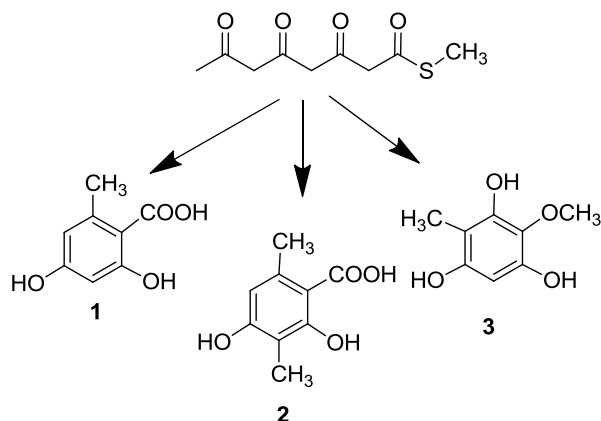


Figure 7. Trois possibilités de cyclisation de l'acide 3,5,7-trioxooctanoïque conduisant à la formation de l'acide orsellinique (1), de l'acide  $\beta$ -orsellinique (2) et de la méthylephloroacétophénone (3).

## Les métabolites principaux

Le noyau aromatique servant de base est très souvent dérivés de l'orcinol ou du  $\beta$ -orcinol (= Composés décarboxylés **1** et **2**, respectivement). Le mode d'assemblage entre deux de ces unités monoaromatiques est à l'origine de la diversité chimique des molécules lichéniques :

- un couplage de type estérification conduit aux **depsides**, ou aux **diphényléthers** s'il s'agit d'une éthérification
- une réaction secondaire d'éthérification permet d'obtenir les **depsidones** à partir des depsides
- un couplage oxydant correspondant à la jonction de deux cycles par une liaison C-C conduit à la formation des **dibenzoquinones**, **dibenzofuranes** et **depsones**

Certains composés monoaromatiques comme le  $\beta$ -orcinol sont fréquemment retrouvés dans les motifs structuraux des métabolites lichéniques. Nous détaillerons ci-après quelques grands types de molécules que nous retrouverons peu-après lors des études phytochimiques des stéréocaulons étudiés. On trouve des **depsides** (ex : atranorine) et des tridepsides (ex : acide gyrophorique) qui correspondent à une réaction d'estérification entre deux ou trois noyaux orcinols (fig.8).

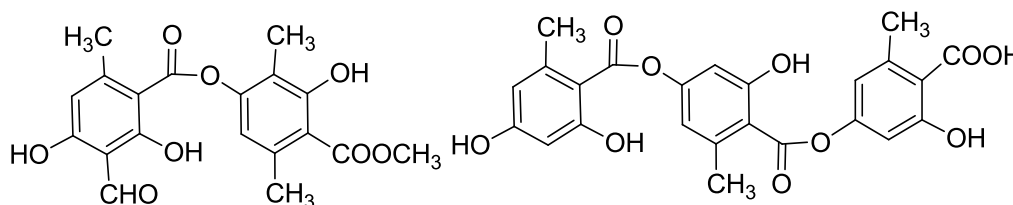


Figure 8. Structure d'un depside (atranorine) et d'un tridepside (acide gyrophorique)

La présence de depsides a été rapportée dans certaines plantes de la famille des Géraniacées (Genre *Erodium*), des Lamiacées (Genre *Salvia*) ou des Papavéracées (Genre *Papaver*). Isolés en même temps que des dérivés polyphénoliques aromatiques de type flavonoïde, il semblerait que ceux-ci soient issues de l'oxydation des flavonoïdes présents dans la plante (Marfak, Trouillas et al. 2002; Ohashi, Kyogoku et al. 1999).

Le couplage oxydant intramoléculaire de depsides peut conduire dans un deuxième temps à la formation de **depsidones** (ex : acide virensique) (fig. 9). D'autres études plus récentes ont démontré que la biosynthèse *in vivo* des depsidones est en fait plus complexe et inclut des réarrangements intramoléculaires (réarrangement de Smiles) (Elix and Wardlaw 2000). Mais l'hypothèse la plus récente sur l'origine biosynthétique des depsidones décrit

plutôt une oxydation à partir du noyau depside suivi d'une de la cyclisation de l'intermédiaire dihydroxydihydrobenzene (Stocker-Wörgötter 2008). Isolées principalement de lichens, la présence de depsidones a été signalée dans les champignons (Li, Li et al. 2008), (Pittayakhajonwut, Dramaie et al. 2006) ainsi que dans les plantes supérieures appartenant au Genre *Garcinia* (Guttiferaceae) (Rukachaisirikul, Naklue et al. 2006). Ces depsidones isolées à partir de champignons et d'Angiospermes (ex : parvifolidone A) sont souvent prénylées c'est-à-dire issues de la combinaison de la voie des acétates-polymalonates et de la voie des mévalonates.

Les **depsones** (ex : acide picrolichénique) (fig. 9) dérivent elles aussi des depsides par oxydation intramoléculaire conduisant à un couplage C-C (Davidson and Scott 1961).

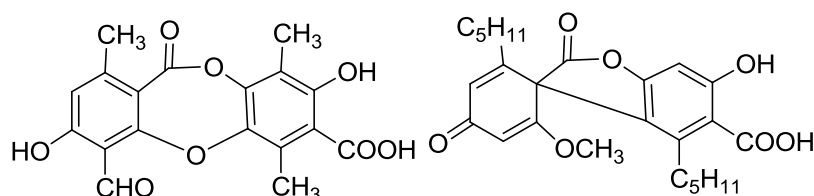


Figure 9. Structure d'une depsidone (acide virensique) et d'une depsone (acide picrolichénique).

La co-occurrence de depsidones et de **diphényléthers** dans le même lichen suggère une relation biosynthétique entre ces composés. Par exemple, la buelline, isolé à partir du lichen *Diploicia canescens* (Milot, Tomasi et al. 2009), peut ainsi être obtenue soit par méthanolyse de la déchlorodiploïcine (comme déjà décrit suivie par une O-méthylation (fig. 10)(Sala, Sargent et al. 1981) ou par méthanolyse directe de la 4-O-méthyldéchlorodiploïcine.

### Dibenzofuranes :

Plusieurs groupes de dérivés dibenzofuranes isolés du genre *Stereocaulon* comme la strepsiline (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992), l'acide porphyrilique (Huneck 1974) et l'acide hypostrepsilalique (Miyagawa, Yamashita et al. 1997)(fig. 11) sont assez spécifiques des lichens. Le représentant le plus commun et le plus abondant dans les lichens est l'acide usnique. Même si ce dérivé de l'acétylméthylphloroglucinol n'est pas un véritable dibenzofurane (fig. 12) (Taguchi, Sankawa et al. 1969) il est, très commun et emblématique des lichens et aussi bien connu pour ses propriétés antibiotiques (Cocchietto, Skert et al. 2002; Ingolfssdottir 2002). L'isomère (+) est décrit dans le Genre *Usnea* alors que l'isomère (-) est parfois présent dans certains *Cladonia*.



## Pourquoi étudier des lichens indonésiens ?

### 1- l'Asie du sud-est

L'Asie du Sud-est (fig. 13) une région du monde située à l'est de l'Inde et au sud de la Chine. Elle comprend le Brunei, le Cambodge, l'Indonésie, le Laos, la Malaisie, la Birmanie, les Philippines, Singapour (parfois rattaché, pour des raisons culturelles, à l'Asie de l'Est et au monde chinois), la Thaïlande, le Timor oriental et le Viêt Nam.



Figure 13. Carte des pays d'Asie du sud-est (<http://math.nie.edu.sg/atcm/map01.htm>)

Tout cet ensemble péninsulaire est sous l'influence de la mousson qui en conditionne, avec des variantes locales dues à la latitude et à l'exposition, le climat, la végétation et par là même la géographie humaine largement conditionnée par l'Agriculture.

La Convention sur la diversité biologique (CDB) adoptée lors du sommet de Rio de Janeiro en 1992 définit de façon formelle la biodiversité (dans son Article 2) comme étant la "variabilité des organismes vivants de toute origine, y compris, entre autres, les écosystèmes terrestres, marins et autres écosystèmes aquatiques et les complexes écologiques dont ils font partie; cela comprend la diversité au sein des espèces, et entre les espèces et ainsi que celle des écosystèmes". Cette biodiversité importante en Asie du sud-est est largement menacée par la déforestation massive pour planter des palmiers à huiles. De nombreuses initiatives ont été menées afin de la préserver et le programme régional Bio-Asie est une initiative de la coopération française lancée vers l'Asie afin de susciter et renforcer dans la région les collaborations de haut niveau et les mises en réseau en matière de recherche et développement

dans le domaine des substances naturelles, de l'étude de la biodiversité à la valorisation par des utilisations durables des substances naturelles en santé, pharmacie, nutrition, agronomie, cosmétique ou énergies renouvelables, qui constituent un enjeu majeur des sciences du vivant. C'est dans ce cadre que ma thèse a été initiée.

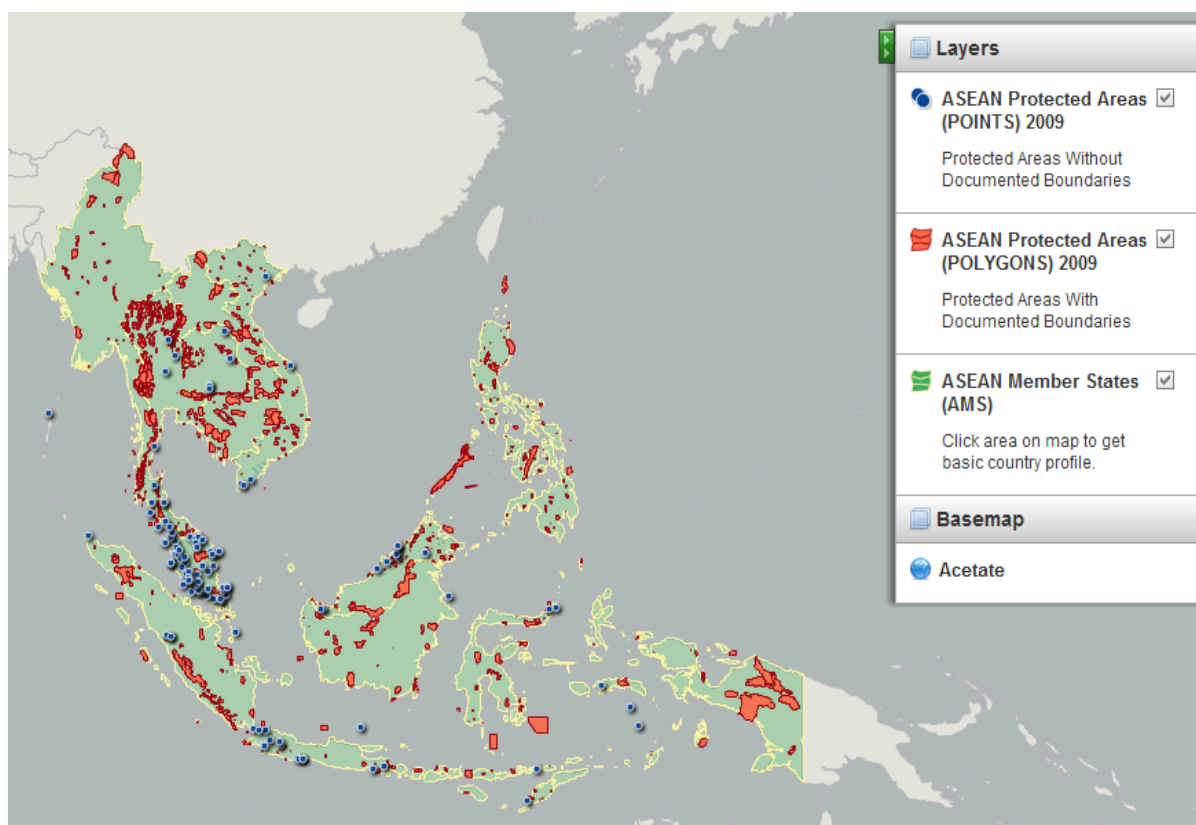


Figure 14. Zones de protection de la biodiversité en Asie du sud est (<http://chm.aseanbiodiversity.org/>)

Plusieurs études botaniques ont été menées et ont permis l'élaboration de catalogues avec des zones de protection disséminées sur toute cette zone et tout particulièrement en Malaisie (telles que les réserves forestières et des sanctuaires) (fig. 14). En ce qui concerne les lichens, des listes partielles sont publiées de façon sporadique et l'on notera une prospection particulièrement avancée en Thaïlande (Wolseley, Aguirre-Hudson et al. 2002) mais de telles *checklists* ou un catalogue général pour les autres régions n'est pas encore disponible (<http://nhm2.uio.no>, 2012). Nous noterons que ce type de travail est particulièrement lourd à mener avec un nombre de spécialistes qui a tendance à se réduire. A titre d'exemple, le catalogue des lichens de France établi par le Dr Claude Roux et ses collaborateurs ne devrait être publié que prochainement.



## 2- l'Indonésie

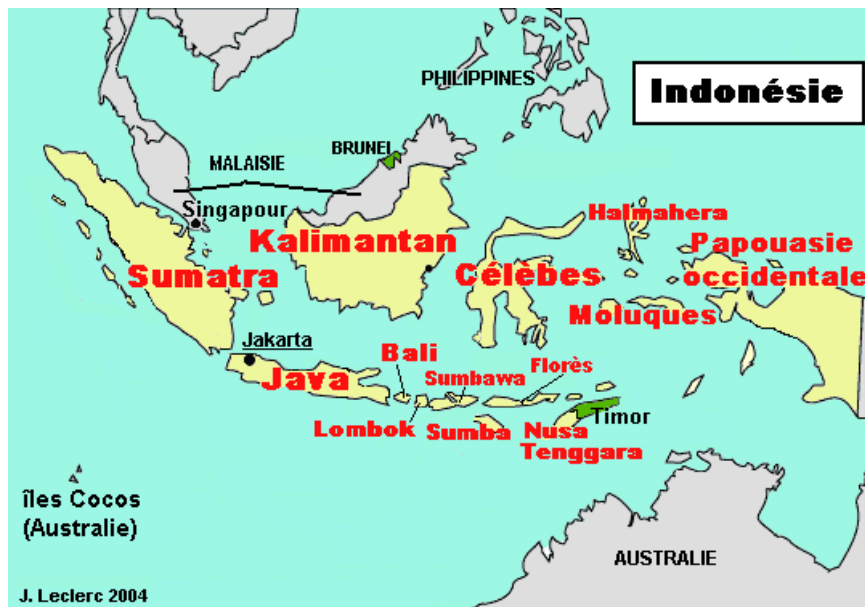


Figure 15. Carte d'Indonésie (<http://www.google.fr/imgres?>)

L'Indonésie correspond à un ensemble d'îles chevauchant l'équateur, entre le 20° parallèle nord et le 10° parallèle sud, sur près de 2 millions de km<sup>2</sup> commençant à l'ouest par la grande île de Sumatra pour se terminer à l'est par l'extrémité occidentale de la Nouvelle Guinée (fig. 15). Cette région est une des plus jeunes archipels de la terre d'où une agitation sismique intense et l'extrême densité de volcans actifs. De Sumatra au Timor on a dénombré plus de 300 volcans, dont plus de 120 actifs. Cela modèle le paysage avec des zones très montagneuses, qui associées à une végétation luxuriante concentre une énorme population (240 millions de personnes) dans quelques zones et en particulier dans l'île de Java, la plus peuplée au monde.

Le climat des archipels est de type maritime équatorial et connaît des variations dues au morcellement insulaire extrême. Deux moussons alternent durant l'année, mais produisent une saison presque uniforme, avec des précipitations réparties sur douze mois et des points maximales durant la période qui va de novembre à avril. Dans certaines zones, comme Sumatra, les précipitations sont supérieures à 4000 mm par an. Le manteau végétal est représenté par la forêt équatoriale aux essences variées. Ce biotope riche est contrasté, possédant une pluviométrie importante et des gradients de températures offre une palette de conditions propices à l'établissement de communautés lichéniques variées.

## Biodiversité

De par sa taille, son climat, l'Indonésie est la deuxième zone la plus riche en biodiversité après le Brésil (Brown 1997 ). Cette riche biodiversité est en danger en Indonésie. En effet, l'Indonésie qui possède près de 80% des dernières forêts tropicales primaires d'Asie du Sud-Est (îles de Bornéo, de Sumatra et en Irian Jaya), a ainsi perdu en 50 ans 72% de ses forêts anciennes (les plantations de palmier à huile ont sextuplé depuis 1985 en Indonésie). Elles sont si rapidement détruites qu'elles auront disparu à 98 % en 2022 si des actions ne sont pas lancées (PNUE 2008). Pour maintenir la biodiversité voire la préserver de l'extinction, le gouvernement indonésien protège certaines zones. Il y a une cinquantaine de zones des parcs de protection de la nature dans les six îles (fig.16). Dédiées à la conservation des plantes, des animaux et de la vie marine en voie de disparition ou à la protection de zones naturelles préservées de l'activité humaine, cela constitue, un réservoir écologique précieux, y compris pour les lichens. La liste des parcs de protection de la nature en Indonésie est détaillée sur ([http://www.dephut.go.id/INFORMASI/TN%20INDO-ENGLISH/tn\\_index.htm](http://www.dephut.go.id/INFORMASI/TN%20INDO-ENGLISH/tn_index.htm)) et la figure 16 illustre leur répartition. En 2008, lors du congrès mondial de l'UICN, la signature d'un accord historique engageant les gouverneurs des 10 provinces de Sumatra montre l'intention de protéger les forêts tropicales et la biodiversité tout particulièrement sur cette île de Sumatra.

A titre d'exemple, 45.000 à 69.000 orangs-outans vivent encore à l'état sauvage à Bornéo et pas plus de 7.300 à Sumatra. En 2010, des scientifiques explorant une forêt isolée en Indonésie ont découvert plusieurs nouvelles espèces florales et animales. Les inventaires de la biodiversité animale sont un sujet d'actualité de même que la biodiversité végétale : la flore de l'Indonésie est constituée d'une variété unique de plantes tropicales se composant d'espèces asiatiques, australiennes ainsi que d'espèces natives. Il y a environ 28 000 espèces de plantes florales différentes en Indonésie dont 2 500 sortes d'orchidées, 6 000 plantes médicinales traditionnelles, 122 espèces de bambous, plus de 350 espèces de rotins et 400 espèces de Dipterocarpus, dont l'ébène, le santal et le teck. Cette biodiversité est beaucoup moins connue pour les champignons et les lichens.

Les Scores de la biodiversité en Asie du sud-est (IB) et de l'indice de conservation (IC) (<http://www.fao.org/DOCREP/003/W5475E/W5475E04.htm>) permettent de placer l'Indonésie avec un indice de biodiversité 2 fois supérieur (IB=28) à celui des Philippines (IB=14) qui est le plus élevé de tous les autres pays d'Asie. Cependant l'indice de

conservation de l'Indonésie (IC<1) est (comme pour la plupart de ces pays) parmi les plus faibles.



Figure 16. Zones de protection de la biodiversité en Indonésie (<http://chm.aseanbiodiversity.org/>)

## Biodiversité et lichens

Certains lichens ont été répertoriés sur l'île de Java et de Sumatra depuis le XIX<sup>ème</sup> siècle (fig. 17). En 1866, W. Nylander recueille quelques lichens dans l'ouest de Java (Nylander 1866). Il a identifié et recueilli 56 espèces de lichens au niveau des monts Pangrango et Bogor (Ile de Java). Puis, lors de deux expéditions en 1950 et 1954, P. Groenhart (Groenhart 1950; Groenhart 1954) découvre 28 nouvelles espèces de lichens (cf liste en Annexe 1) dans les montagnes de Java (Est de Java (Malang, Mont Ardjuno) et Ouest de Java (Mont Pangrango, Cibodas, Mont Gede, Mont Gegerbentang)). Par la suite, Zahlbruckner lors d'une expédition identifie plusieurs espèces de Stéréocaulon qu'il a précédemment récoltées dans des zones rocheuses de montagne à Java (Ouest de Java : Tangkuban perahu, Mont Salak, Mont Gede, Mont Pangrango) (Zahlbruckner 1956).



Figure 17. Carte de Sumatra et de Java avec endroits de récolte

En pointillés sont représentées les zones d'expédition de Nylander, Groenhart et Zahlbrückner

Au niveau de l'herbier des Abbayes (hébergé au sein de notre Equipe de Recherche), nous avons retrouvé sept spécimens pour les trois espèces du genre *Cladonia* récoltés sur l'île de Java (Mont Pangrango et Gede) et une de Bornéo (fig.18). Les espèces sont:

1. *Cladonia gymnopoda* Vain.
2. *Cladonia pityrea* (Flörke) Fr.
3. *Cladonia signata* (Flörke) Fr.

A Sumatra, la sixième plus grande île dans le monde, le Dr A. Zahlbruckner a récolté en 1934 de nombreux lichens dans le sud, le nord et la région centrale (Zahlbruckner 1934). Un lichen crustacé, *Phaeographina maxima*, trouvé dans les zones rocheuses de Solok a été signalé comme une nouvelle espèce par Groenhart (Groenhart 1958).



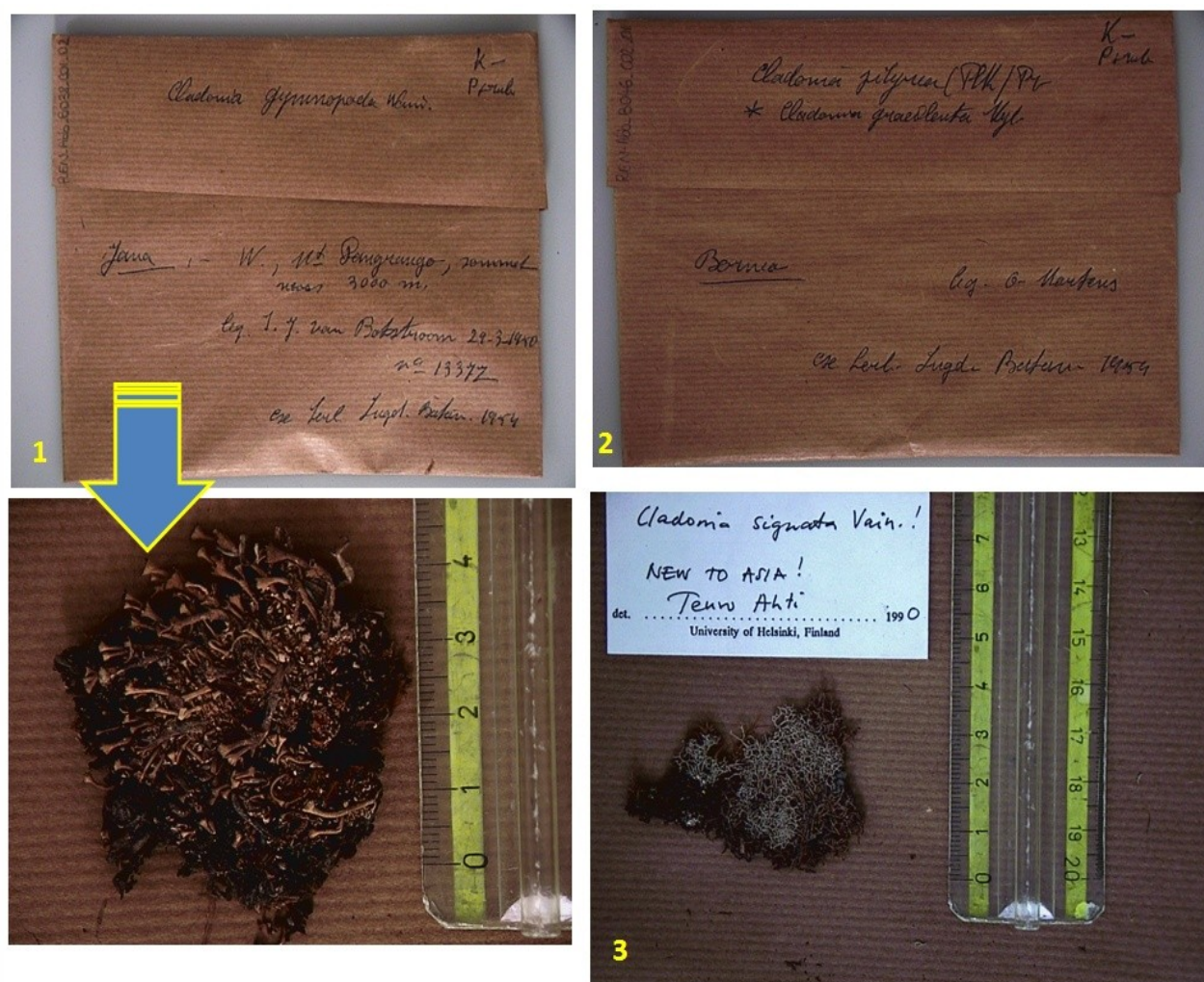


Figure 18. Spécimens de l'herbier des Abbayes (genre *Cladonia*) récoltées en Indonésie (1= *C. gymnopoda* Vain., 2= *C. pityrea* (Flörke) Fr., 3= *C. signata* (Flörke) Fr.)

Nous avons commencé à répertorier les espèces de lichens présents en Indonésie d'après la bibliographie en nous aidant de documents présents au niveau de l'Herbier Des Abbayes. Nous espérons ainsi réaliser un catalogue bibliographique des lichens comme celui réalisé en Thaïlande (Wolseley, Aguirre-Hudson et al. 2002). Il sera ensuite intéressant de réaliser la comparaison des espèces présentes dans les 11 Herbarium présents en Indonésie (tableau 24 dans annexe) avec ceux des espèces décrites pendant ces deux derniers siècles et ce, avant d'entamer avec l'aide de lichénologues confirmés une réelle prospection.

## Lichens et médecine

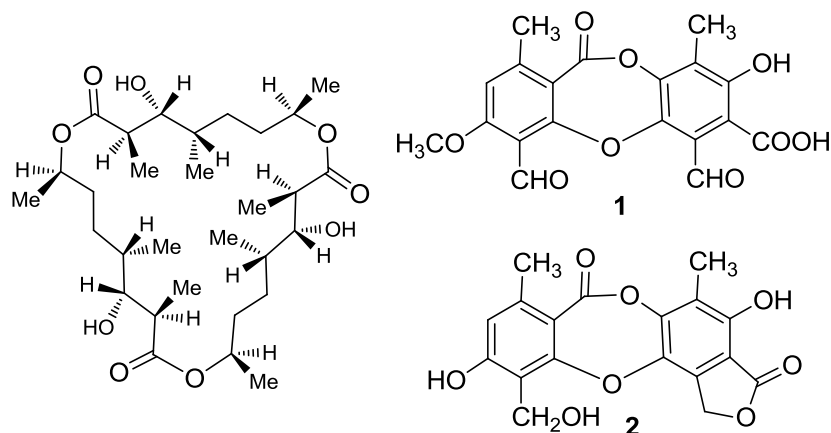
Certains lichens sont utilisés en médecine traditionnelle. Les lichens du genre *Usnea*, connus sous le nom de "kayu angin" sont largement utilisés en médecine traditionnelle pour traiter la toux, la diarrhée et les douleurs abdominales (Wahyuono, Sudarsono et al. 1995). De plus, il entre dans la composition de spécialités de phytothérapie dont l'une est appelée Jamu (Wahyuono and Subagus 1994) et dont le nom commercial est Benalu Teh® (Fig.19). En général ces présentations sont des mélanges sous forme de poudres ou de fragments coupés grossièrement qui sont consommés sous forme de décoctés.



Figure 19. Genre *Usnea* trouvée dans les constituants de Jamu Benalu Teh®

Quelques recherches phytochimiques relatives à des molécules issues de lichens récoltés à Sumatra ont été publiées. La dasypogalactone, un macrolide a été isolé du lichen *Usnea dasypoga* récolté sur le Mont Kerinci, Sumatra (Suwarso, Gani et al. 1999). Une autre espèce, *Usnea articulata*, qui entre dans la composition d'une fameuse préparation traditionnelle, le Benalu Teh® (en compagnie de plantes du genre *Scurrulla* (*S. ferruginea*) (Loranthaceae)), a été étudiée au laboratoire de Rennes. À partir d'*U. articulata*, plusieurs dérivés de l'acide stictique ont été isolés en compagnie d'autres composés courants comme

l'acide usnique et l'atranorine. Ces dérivés ont été étudiés et ont démontré une certaine activité antioxydante (Lohézic - Le Dévéhat, Tomasi et al. 2007).



**Figure 20.** Dasyvogalactone et deux dérivés l'acide stictique isolés à partir *U. dasypoga* et *U. articulata*

A partir d'un lichen foliacé *Parmotrema saccatilobum* qui est utilisé en Nouvelle Guinée sous forme d'un onguent obtenu par macération dans l'huile et appliqué en cas de coups, contusions, douleurs articulaires, Bugni et al 2009 ont pu identifier le rôle antiinflammatoire joué par l'atranorine qui est en quantité très importante dans ce lichen (Bugni, Andjelic et al. 2009).

Nous avons récolté plusieurs lichens sur le Mont Singgalang et le plateau Simanau, Solok, à l'ouest de Sumatra. Ceux-ci appartiennent, aux genres *Lobaria*, *Sticta*, *Cladonia* et *Stereocaulon*. Nous avons rapidement focalisé notre étude sur trois espèces intéressantes du genre *Stereocaulon*, Ils correspondent à *Stereocaulon halei*, *S. graminosum* et *S. montagneanum* dont le détail de l'identification est donné dans la première partie de la thèse. L'aide du Dr Harrie Sipman, Museum de Berlin dont nous pu aussi bénéficier a été d'un grand secours. Ces espèces se trouvent couramment dans les zones rocheuses et exposées au soleil, de sorte que leur récolte a permis d'obtenir les trois échantillons de notre collection. Deux espèces (*S. halei* et *S. montagneanum*) sont en quantité suffisante pour faire des recherches plus approfondies sans menacer le biotope (fig.21).





Figure 21. Sites de récolte des Stéréocaulons (*S. graminosum* (A) et *S. halei* (B)) sur le Mont Singgalang et *S. montagneanum* sur le plateau Simanau, Solok, l'Ouest de Sumatra, Indonésie)





## **PARTIE 1**

### **Criblage de quelques espèces de Stéréocaulons**



---

## 1 Généralités sur le genre *Stereocaulon*

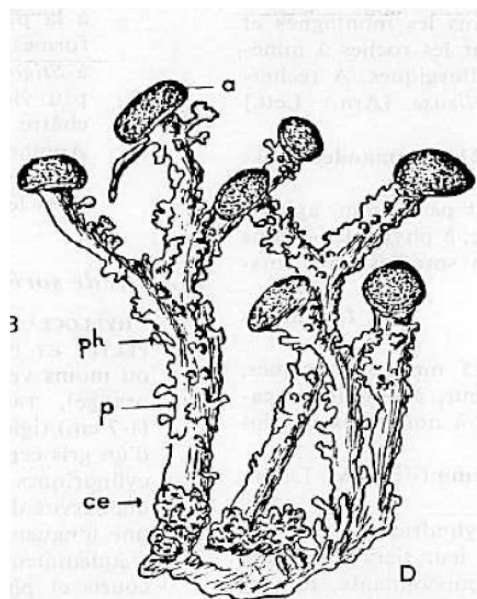
Les lichens du genre *Stereocaulon* sont largement répandus et 130 espèces ont été à ce jour recensées (Kirk, Cannon et al. 2001). Déjà en 1977, Lamb, spécialiste des Stéréocaulons avait évalué le nombre d'espèces de Stéréocaulons à 123 avec 47 variétés et 40 formes supplémentaires. Ces lichens se retrouvent le plus souvent en altitude sur des roches siliceuses, particulièrement sur des roches volcaniques, des terrils riches en métaux, des sols acides et parmi les mousses sur le sol.

Au niveau de leur classification au sein des Fungi, ils appartiennent à la classification suivante :

Classe	: Ascomycètes
Sous-classe	: Ascomycetidae
Ordre	: Lecanorales
Famille	: Stereocaulaceae
Genre	: <i>Stereocaulon</i>

Le genre *Stereocaulon* fait partie des lichens dits complexes : il possède un thalle primaire réduit et un thalle secondaire fruticuleux plus conséquent. Le thalle primaire est composé de granules basales appelées phylloclades qui se présentent soit sous forme crustacées ou squamuleuses. Chez la plupart des stéréocaulons, le thalle primaire disparaît rapidement mais dans de rares cas, il est persistant et cette caractéristique est un critère important pour leur classification. Le thalle secondaire est souvent très ramifié, en forme d'arbuste, érigé et forme alors un pseudopodétion (fig. 22). Ce pseudopodétion possède un axe compact cartilagineux (différence essentielle par rapport aux *Cladonias* dont l'axe est creux) formé par des hyphes parallèles entourés d'une médulle lâche. Ce pseudopodétion peut être cortiqué ou non, couvert de phylloclades dont la forme peut être variée (en bouclier, coralloïdes, sous forme de rameaux, squamuliformes...). Certains Stéréocaulons peuvent posséder des céphalodies contenant des cyanobactéries appartenant aux genres *Nostoc*, *Scytonema* ou *Stigonema* mais le photobionte primaire est une algue verte appartenant au genre *Trebouxia*.

Les apothécies sont en position terminale ou latérale et le disque devient souvent convexe à presque globuleux de couleur marron claire à foncée. L'hypothécium est le plus souvent non coloré mais peut être occasionnellement marron foncé. En Europe, les asques sont clavées à cylindriques et contiennent 8 spores. Les ascospores sont sans couleur, ellipsoïdes, aciculées ou fusiformes et avec 1 à 13 septa pour la plupart.

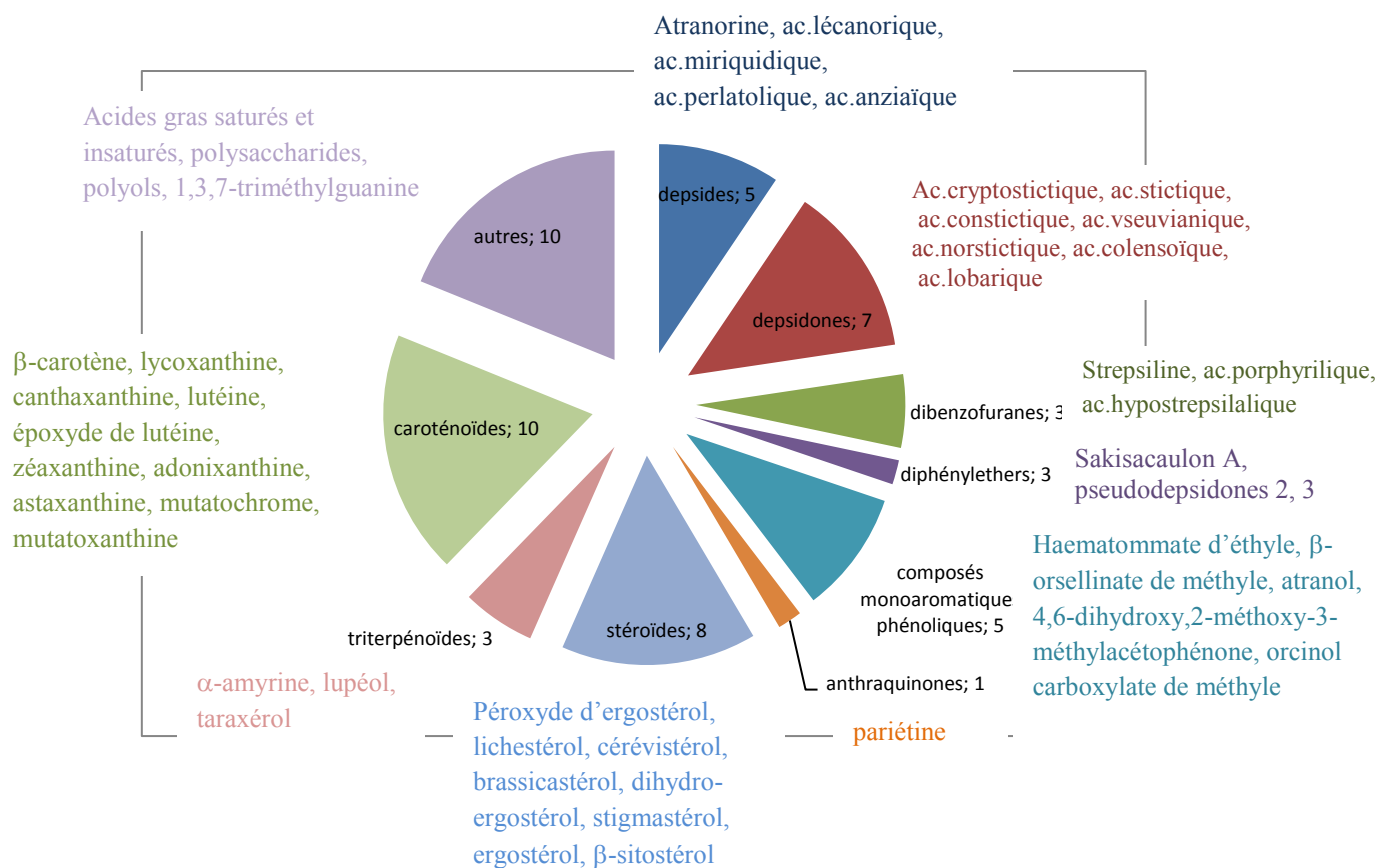


**Figure 22. Illustration de la morphologie générale d'un Stéréocaulon (J. Asta)**  
**a : apothécie ; ph : phylloclade ; p : pseudopodétion ; ce : céphalodie**

Les Stéréocaulons appartiennent à un genre peu étudié car leur identification est difficile et seules 36 espèces et sous-espèces ont été étudiées phytochimiquement (tableau 25 dans annexe). Les composés retrouvés (fig. 23) appartiennent :

- aux dérivés de la voie acétate – polymalonate comme les depsidones, depsides, composés monoaromatiques, diphenyl éthers, benzofuranes, anthraquinones. Les depsidones les plus fréquemment retrouvées sont l'acide stictique et l'acide lobarique. Le depside le plus commun est l'atranorine.
- aux dérivés de la voie mévalonate comme les terpènes, stéroïdes, triterpènes et caroténoïdes
- aux dérivés des sucres : le polyol D-arabitol étant fréquemment retrouvé

Il n'existe pas de dérivés appartenant à la voie de l'acide shikimique isolés à ce jour dans le genre *Stereocaulon*.



**Figure 23. Répartition des composés isolés du genre Stéréocaulon d'après la bibliographie (les références et structures figurent en annexe3).**

Cette investigation relativement partielle de la chimie de ces lichens a stimulé notre intérêt pour ce genre. Nous avons donc travaillé à partir d'échantillons qui ont pu être recueillis par moi-même en Indonésie, par Nina Corlay (étudiante en pharmacie) à l'Ile de la Réunion ou par Jean-Michel Sussey (membre de l'AFL), Françoise le Devehat et Joël Boustie en France et en Italie.

---

## 2 Etude préalable des 9 espèces de *Stereocaulon* récoltées

Les échantillons ont été récoltés en zone tempérée et en zone tropicale au gré des opportunités de ramassage des 4 principaux récolteurs et ont été enregistrés dans l'herbier de notre laboratoire.

En zone tempérée, les échantillons proviennent essentiellement de Bretagne et des Alpes pour la métropole ainsi que de Sicile pour l'Italie :

- *S. grande* a été récolté à La crèmerie du glacier, Haute Savoie à une altitude de 1200 m (référéncé sous le code JB/09/116)
- *S. dactylophyllum* a été récolté sur les Ardoisière de Commana en Bretagne à une altitude de 260 m (référéncé sous le code JB/10/120)
- *S. evolutum* a été récolté à deux endroits : sur les Ardoisière de Commana en Bretagne à une altitude de 260 m ainsi qu'à La Palette Rocher à St Just en Ile et Vilaine (altitude 84 m). Deux échantillons morphologiques ont été récoltés à Commana : un échantillon sans apothécies (appelé *S. evolutum sans apothécie*) et un échantillon avec apothécie (appelé *S. evolutum bis apothécié*) (référéncé sous le code JB/10/121a-b-c)
- *S. vesuvianum* a été récolté sur les flancs de l'Etna en Sicile (Italie) (référéncé sous le code JB/02/01)

En zone tropicale, les échantillons ont été récoltés sur des massifs volcaniques de l'île de la Réunion et d'Indonésie :

- *S. halei* a été récolté sur le Mont Singgalang, Sumatra en Indonésie à une altitude de 2800 m (référéncé sous le code JB/09/117)
- *S. graminosum* a été récolté au même endroit que *S. halei* (référéncé sous le code JB/09/118)
- *S. montagneanum* a été récolté dans la Plateau Simanau, Sumatra (1500 m) (référéncé sous le code JB/09/119)
- *S. vulcani* a été récolté dans la région de Grand pays au lieu exact de la vallée de rivière Langevin à 1000 m sur l'Ile de la Réunion (référéncé sous le code JB/11/122)
- *S. scutelligerum* a été récolté au même endroit que *S. vulcani* (référéncé sous le code JB/11/123)

Au total, neuf espèces de stéréocaulons ont été récoltées et dix échantillonnages ont été réalisés (deux échantillons pour *S. evolutum*).

Au cours de l'histoire, ces lichens ont porté plusieurs synonymes (tableau 1) et les recherches bibliographiques ont concerné l'ensemble de ces appellations.

**Tableau 1. Synonymies des espèces de Stéréocaulons récoltées**

*Les points d'interrogation signifient que l'espèce n'a pas été clairement identifiée comme telle.*

<i>Espèce</i>	<i>Synonymie</i>
<i>S. grande</i> (Magn.)Magn.	<i>S. paschale</i> var. <i>grande</i> Magn. ; <i>S. alpinum</i> var. <i>grande</i> (Magn.)Frey
<i>S. vesuvianum</i> Pers.	<i>S. botryosum</i> subsp. <i>vesuvianum</i> (Pers.)Ach. ; <i>S. alpinum</i> var. <i>vesuvianum</i> (Pers.)Link ; <i>S. denudatum</i> var. <i>vesuvianum</i> (Pers.)Laur. ex.Hepp. ; <i>S. denudatum</i> Flörke
<i>S. graminosum</i> Schaer.	<i>S. turgescens</i> Nyl.
<i>S. vulcani</i> (Bory)Ach.	<i>S. flavireagens</i> Gyeln. ; <i>S. flavireagens</i> f. <i>cinerascens</i> Magn. Ex.Magn. et Zahbr. ; <i>S. flavireagens</i> f. <i>densum</i> Magn.
<i>S. evolutum</i> Graewe	-
<i>S. dactylophyllum</i> Flörke	<i>S. corraloides</i> Magn. ; <i>S. coralloides</i> Frey (Th-Fr) ; <i>S. coralloides</i> Fr. : <i>S. paschale</i> subsp. $\alpha$ <i>coralloides</i> (Fr.)Branth et Rostr. ; <i>S. coralloides</i> var. <i>dactylophyllum</i> (Flörke) ; <i>S. corallinum</i> (L.)Schrad.
<i>S. scutelligerum</i> Th.Fr.	<i>S. vulcani</i> subsp. <i>richardianum</i> Mont. Ex Th.Fr. ; <i>S. richardianum</i> (Mont.)Zahlbr. , <i>S. salazinum</i> ? <i>S. vulcani</i> Th.Fr.
<i>S. halei</i> Lamb	<i>S. massartianum</i> Hue ; confondu avec <i>S. pseudomassartianum</i>
<i>S. montagneanum</i> Lamb	<i>S. corraligerum</i> Meyer ; <i>S. ramulosum</i> ?

Neuf espèces sont à priori distinguées mais les difficultés pour l'identification et la classification de ces espèces nous ont amené à considérer plusieurs approches (botanique, phylogénétique et chimique) pour les caractériser avant d'étudier de manière plus ou moins approfondie (selon la biomasse disponible) les métabolites secondaires des ces espèces.



## 2.1 Etude botanique

Compte tenu de la complexité de ce genre, les études d'identification menées au laboratoire ont été discutées avec des lichénologues spécialisés. L'identification de *S. grande* a été confirmée par JM Sussey (AFL), celles de *S. halei*, *S. montagneanum* et *S. graminosum* a été particulièrement étudiés par H. Sipman (Museum Berlin) tandis que celle des 5 espèces restantes a été réalisée par O. Bricaud. Nous avons conduit une observation macroscopique et microscopique de ces espèces. Nous avons aussi pu bénéficier des commentaires de M. Grube (Univ Graz) lors de son invitation au laboratoire en juillet 2011. La comparaison avec les échantillons de la collection Des Abbayes a aussi été particulièrement utile.

### 2.1.1 Observation macroscopique

Nous avons choisi de classer nos 9 espèces de *Stereocaulon* récoltées en France, en Italie, à l'Ile de la Réunion et en Indonésie selon leur morphologie générale en trois groupes. Ensuite, pour chaque espèce, l'observation macroscopique a pris en compte :

- La présence d'un thalle primaire persistant ou fugace
- La taille du pseudopodétion (longueur, diamètre)
- L'aspect et la taille des phylloclades
- La présence de céphalodies (contenant des cyanobactéries), leur aspect et leurs dimensions
- La présence d'apothécies, leur aspect et leurs dimensions

Nos échantillons se répartissent donc en trois groupes de la manière suivante :

- Groupe 1 : *S. graminosum*, *S. vesuvianum*, *S. vulcani*
- Groupe 2 : *S. dactylophyllum*, *S. evolutum*, *S. grande*,
- Groupe 3 : *S. halei*, *S. montagneanum*, *S. scutelligerum*

#### 2.1.1.1 Groupe 1 (Tableau 2)

Ces lichens ne possèdent pas de thalle primaire persistant. Leur pseudopodétion, érigé et dont les dimensions sont semblables (excepté pour *S. graminosum* qui possède une section plus grande) n'est pas ramifié et possède une symétrie dorsiventrale avec ainsi peu de phylloclades présentes sur la face dorsale.

Les phylloclades de *S. vesuvianum* sont rapidement peltées alors que chez *S. graminosum* et *S. vulcani*, elles sont digitées puis coralloïdes pour devenir enfin peltées. Quelques céphalodies sont visibles chez *S. graminosum* et aucune n'ont été retrouvées chez les autres espèces alors qu'elles ont été décrites chez *S. vesuvianum*.

Les apothécies sont en position latérale, proches de l'apex pour *S. vesuvianum* et *S. vulcani* alors que pour *S. graminosum*, elles se trouvent aussi bien en position terminale que latérale. On constate que la taille des apothécies pour *S. graminosum* est supérieure aux autres et que *S. vulcani* possède de très nombreuses et petites apothécies.

#### 2.1.1.2 Groupe 2 (tableau 3)

Ces lichens ne possèdent pas de thalle primaire persistant et forment des touffes car leur pseudopodétion est ramifié de façon irrégulière.

Le pseudopodétion de *S. dactylophyllum* est décrit comme plus grand que les autres espèces de ce groupe mais parmi les espèces récoltées, toutes atteignaient de 1.5 à 3 cm maximum. Le thalle de *S. evolutum* forme des coussins compacts et seulement le tiers supérieur était couvert de phylloclades. Le pseudopodétion possède une organisation dorsiventrale comme pour *S. grande*. Cependant, pour *S. dactylophyllum* et *S. grande*, les ramifications ne sont pas aussi compactes et les ramifications des pseudopodétions sont nettement visibles.

La forme des phylloclades est proche : strictement coralloïde pour *S. grande*, digitée et granuliforme pour *S. evolutum* et *S. dactylophyllum*.

La taille des apothécies de *S. dactylophyllum* est plus petite que pour les autres espèces mais elles sont plus nombreuses et localisées à l'apex de chaque rameau latéral. En ce qui concerne *S. evolutum*, les apothécies sont plus grandes et localisées aussi bien en position latérale que terminale comme pour *S. grande*. Cependant autant sont-elles rares pour *S. evolutum*, autant sont-elles fréquentes pour *S. grande* et *S. dactylophyllum*.

Quelques céphalodies ont été retrouvées chez *S. grande* mais elles étaient rares et localisées en position médiane sur le pseudopodétion et ses ramifications.

#### 2.1.1.3 Groupe 3 (tableau 4)


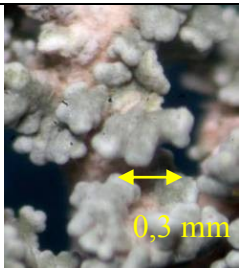

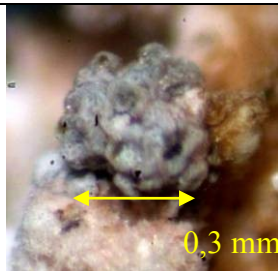

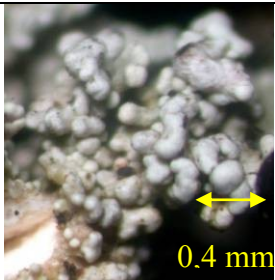


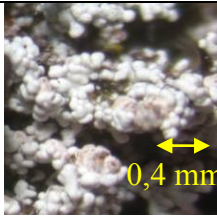

Ces lichens ne possèdent pas de thalle primaire permanent. Ils possèdent des ramifications cylindriques attachées au pseudopodétion et diffèrent du groupe 2 car les phylloclades ramifiées n'apparaissent pas comme des ramifications du pseudopodétion principal mais comme des élongations des phylloclades formant ainsi des phylloclades ramifiées responsables de l'activité photosynthétique. La hauteur et le diamètre des pseudopodétions est plus importante pour *S. montagneanum* que pour les deux autres espèces de ce groupe. Les apothécies, très nombreuses chez *S. halei* sont en position terminale comme pour *S. montagneanum* sur les rameaux latéraux alors que pour *S. scutelligerum*, elles apparaissent seulement en position latérale sur les rameaux. La taille des apothécies est plus petite pour *S. scutelligerum* que pour *S. halei* et *S. montagneanum*. Il semble que certains thalles soient dévolus à porter des apothécies chez *S. halei* alors que d'autres semblent dédiés à la photosynthèse.

Les céphalodies ont été observées seulement chez *S. halei* et *S. montagneanum*. Leur taille et leur couleur sont similaires : gris pâle pour *S. halei* et marron foncé pour *S. montagneanum* mais le nombre est différent : on observe entre 1 - 5 céphalodies par thalle pour *S. halei* et entre 3 - 10 céphalodies pour *S. montagneanum*

**Tableau 2. Comparaison des caractéristiques morphologiques de *S. vesuvianum*, *S. graminosum*, *S. vulcani***


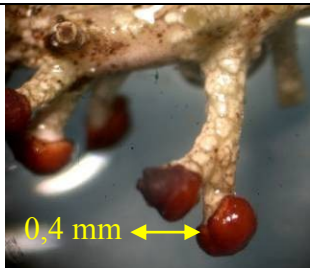
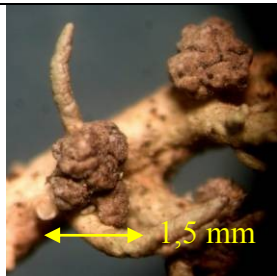

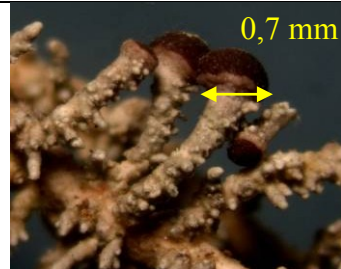
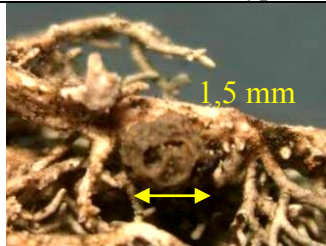

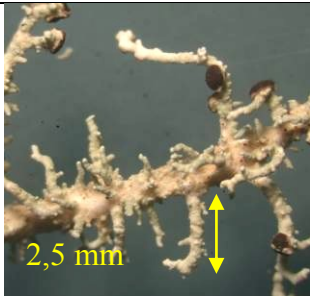
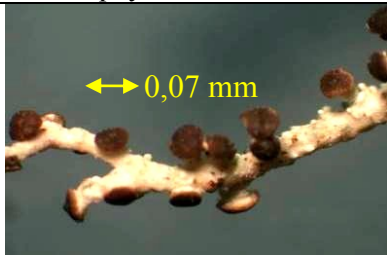
	Aspect général	Détail des phylloclades	Apothécies	Céphalodies
<i>S. vesuvianum</i>	 <p>L : 5-45 mm l : 0.3-0.8 mm</p>	 <p>peltée taille : 0.58-0.96 mm</p>	 <p>taille : 0.37-0.65 mm en position latérale sur le bord du pseudopodétion</p>	<p>elles sont rares et non vues dans nos échantillons</p> <p>normalement de type sphérique</p>
<i>S. graminosum</i>	 <p>L : 5-40 mm l : 1.5-3.7 mm</p>	 <p>granuliforme, verruqueuse puis peltée L : 0.13-0.4 mm</p>	 <p>taille : 0.63-1.39 mm en position latérale</p>	 <p>taille : 0.61-0.93 mm sur tout le long du pseudopodétion type sphérique</p>
<i>S. vulcani</i>	 <p>L : 2-2.5 mm l : 0.5-1.1 mm</p>	 <p>verruciforme, granuliforme puis peltée taille : 0.5-1.1 mm</p>	 <p>taille : 0.35-0.72 mm en position latérale du pseudopodétion</p>	<p>absentes jamais observées</p>

**Tableau 3. Comparaison des caractéristiques morphologiques de *S. grande*, *S. evolutum*, *S. dactylophyllum***

	Aspect général	Détail des phylloclades	Apothécies	Céphalodies
<i>S. grande</i>	 <p>L : 5-29 mm l : 0,5-1,52 mm</p>	 <p>coralloïde taille &lt; 0,43 mm</p>	 <p>taille : 1,04-1,65 mm en position terminale du pseudopodétion et des ramifications</p>	 <p>taille : 0,13-0,5 mm type sphérique</p>
<i>S. evolutum</i>	 <p>L : 22-33 mm l : 0,2-1 mm</p>	 <p>coralloïde, digité, papilliforme taille : 0,36-0,48 mm</p>	 <p>2 échantillons ont été récoltés et les apothécies proviennent de ceux avec apothécies taille : 1,01-1,44 mm en position terminale sur la partie supérieure du pseudopodétion</p>	<p>non observées</p> <p>décrites comme indistinctes et de type sphérique</p>
<i>S. dactylophyllum</i>	 <p>L : 11-15,3 mm l : 1-1,44 mm</p>	 <p>coralloïde, digité, granuliforme taille : 0,36-0,48 mm</p>	 <p>taille : 0,5-1,15 mm sur l'apex de chaque ramification du pseudopodétion</p>	<p>non observé</p> <p>décrites comme souvent absentes et de type sphérique</p>



**Tableau 4. Comparaison des caractéristiques morphologiques de *S. halei*, *S. montagneanum*, *S. scutelligerum***

	Aspect général	Détail des phylloclades	Apothécie	Céphalodies
<i>S. halei</i>	 <p>L : 5-43 mm l : 0,66-0,94 mm</p>	<p>rameaux phyllocladioïdes taille : 1,13-2,28 mm</p>	 <p>taille : 0,40-0,55 mm en position terminale sur chaque rameau phyllocladioïde</p>	 <p>taille : 0,67-2,09 mm en position latérale sur le pseudopodétion et les ramifications type scrobiculée</p>
<i>S. montagneanum</i>	 <p>L : 49,4-81,8 mm l : 0,98-1,65 mm</p>	<p>rameaux phyllocladioïdes taille : 0,6-1,13 mm</p>	 <p>taille : 0,69-0,96 mm en position terminale sur chaque rameau phyllocladioïde</p>	 <p>taille : 0,36-2,06 mm en position latérale sur le pseudopodétion type scrobiculée</p>
<i>S. scutelligerum</i>	 <p>L : 15-45 mm l : 0,74-1,6 mm</p>	 <p>rameaux taille : 2,5 mm</p>	 <p>taille : 0,03 – 0,12 mm en position latérale sur chaque rameau</p>	<p>jamais décrit</p>

Afin de compléter la description macroscopique, des observations microscopiques ont été réalisées à partir des apothécies et des céphalodies.

### 2.1.2 Observation microscopique

Quand elles étaient présentes, les apothécies et les céphalodies sont coupées et observées dans l'eau entre lame et lamelle. Nous avons choisi de retenir la taille de l'hyménium, la taille de l'hypothécium, les dimensions de l'ascospore, le nombre de septa des ascospores comme critères majeurs. Ils figurent dans les tableaux 6-8. Les mesures ont été prises après immersion des échantillons dans une solution de potasse à 3%. Le bleu coton lactophénol a également été utilisé (cf partie expérimentale sec.2.1.1).

Nous avons résumé les caractéristiques obtenues pour chacune des espèces dans le tableau 9 en catégorisant chaque critère :

- Hyménium inférieur à 75  $\mu\text{m}$  ou supérieur à 100  $\mu\text{m}$
- Hypothécium inférieur ou supérieur à 75  $\mu\text{m}$
- Taille des spores inférieure ou supérieure à 40  $\mu\text{m}$
- Nombre de septa des spores inférieur ou supérieur à 4
- Genre de cyanobactérie (aspect morphologique) lorsqu'elle était présente dans les céphalodies

Les groupes 1 et 2 définis précédemment possèdent un hyménium et un hypothécium moins hauts que les espèces du groupe 3 sauf pour *S. scutelligerum* dont les mesures sont intermédiaires. La taille des spores est hétérogène d'un groupe à l'autre mais la majorité des espèces du groupe 1 et 2 (à l'exception de *S. grande* et *S. vulcani* possèdent des spores de petite taille ( $< 40 \mu\text{m}$ ). Pour toutes les espèces, sauf *S. vesuvianum* et *S. montagneanum*, le nombre de septa est limité et  $\leq 4$ . Le genre de cyanobactérie est très variable et ne semble pas être corrélé à la morphologie des Stéréocaulons : on retrouve aussi bien le genre *Stigonema* dans des espèces du groupe 1 (ex. *S. vesuvianum*) que dans des espèces du groupe 2 (ex : *S. grande*).

Les céphalodies présentes sur les pseudopodétions de *S. halei* et *S. montagneanum* sont plus nombreuses et elles ont fait plus particulièrement l'objet de nos observations.

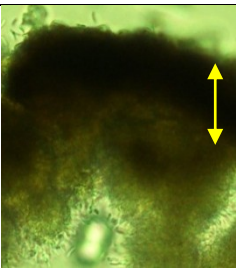
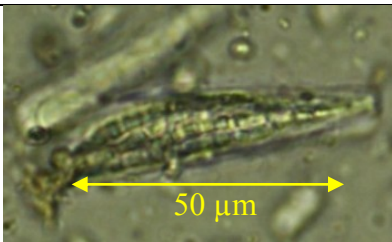
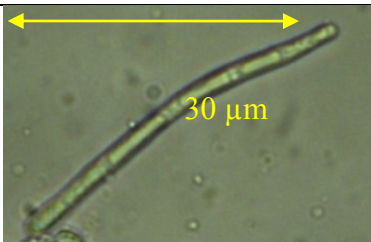
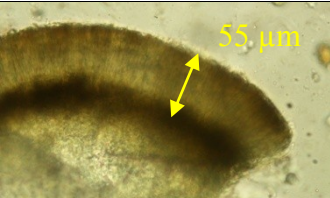

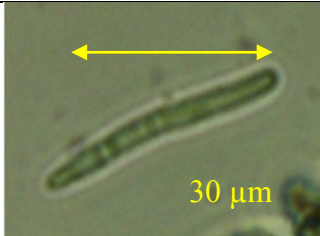

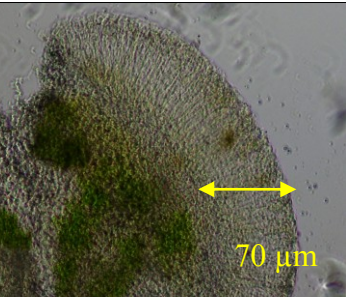
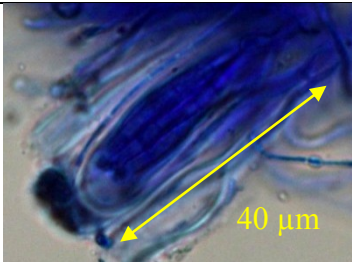
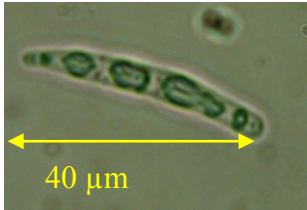
Après les avoir observées macroscopiquement à la loupe binoculaire, plusieurs traitements ont été réalisés afin de les observer microscopiquement :

- Elles ont été plongées dans une solution de digitonine à 0,01% afin de dissocier les hyphes céphalodiales de la cyanobactérie et d'identifier le genre auquel appartiennent les cyanobactéries présentes
- Elles ont été incluses dans un bloc de paraffine et les coupes semi-fines (1 µm) obtenues via le microtome ont été colorées avec une solution trichromique d'Hématéine-Eosine-Safran (H.E.S.) (cf partie expérimentale sec. 2.1.1)
- Une déshydratation suivie d'une métallisation a également été conduite afin de les observer au microscope électronique à balayage (MEB) (cf partie expérimentale sec. 2.1.2).

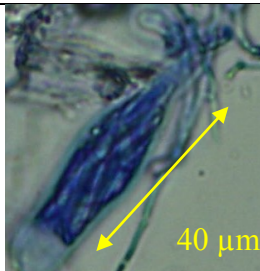
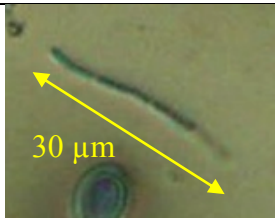
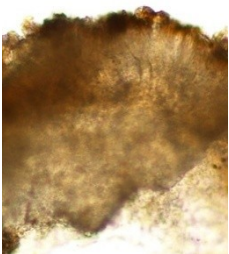
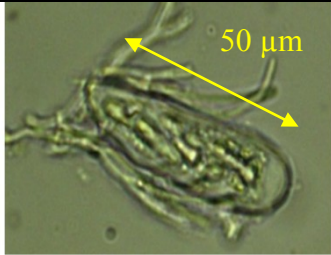
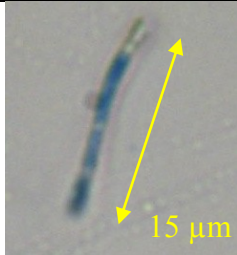
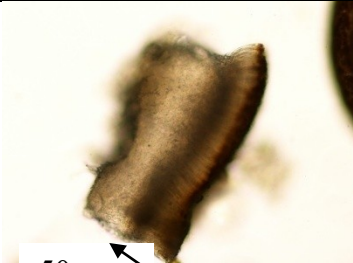

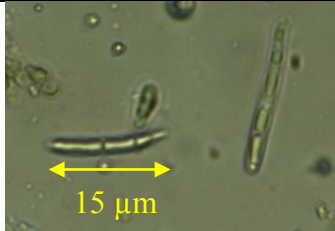
Les céphalodies de *S. halei* et *S. montagneanum* possèdent un cortex différencié et l'organisation de ces deux céphalodies fait penser à une structure scrobiculée telle que décrite par Johnson (Johnson 1938), Lamb (Lamb 1951) et Duvigneaud (Duvigneaud 1956). Les coupes longitudinales (Tableau 5) des céphalodies de *S. halei* montrent un cortex mal délimité à l'intérieur duquel se trouvent des hyphes compactées : ces céphalodies sont de type protosacculé (Lamb 1976). Les coupes de céphalodies de *S. montagneanum* s'en distinguent par le cortex qui apparaît très bien délimité et les hyphes sont lâches à l'intérieur (aspect arachnoïde) : la céphalodie est alors dite de type sacculé (Lamb 1976). Cette particularité est moins visible sur les clichés pris au MEB car l'étape de déshydratation empêche d'observer correctement l'aspect interne de la céphalodie.



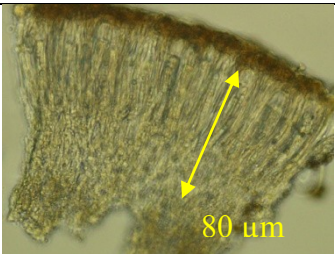
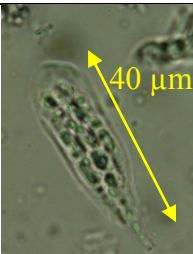
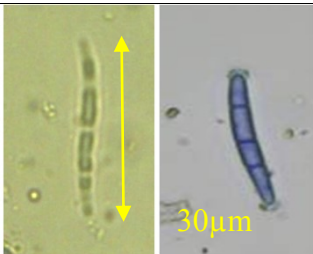
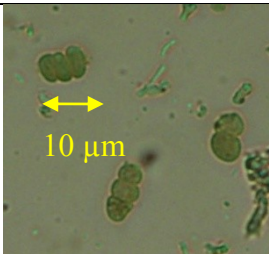
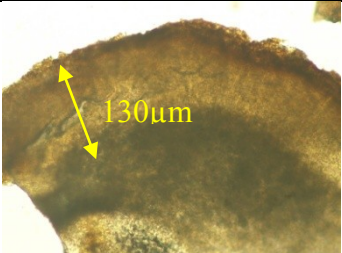


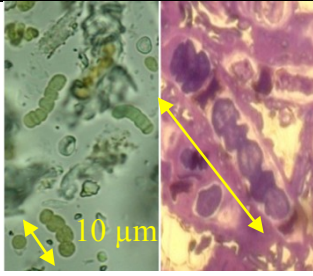
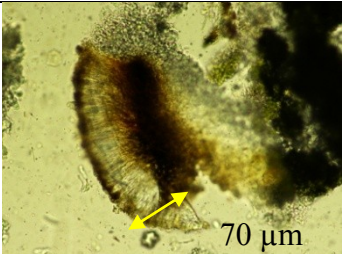
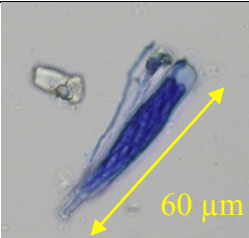

**Tableau 5. Comparaison des caractéristiques morphologiques de *S. vesuvianum*, *S. graminosum*, *S. vulcani***

	Hyménium	Hypothécium	Asques	Spores	Cyanobactérie
<i>S. vesuvianum</i>	 <p>55 µm</p> <p>taille : 50-55 µm coloré</p>	<p>taille : 25-32,5 µm peu coloré</p>	 <p>50 µm</p> <p>taille : 47,5(55) x 10(12,5) µm</p>	 <p>30 µm</p> <p>taille : 25(32,5) x 2,5(3) µm 4-6 septa</p>	<p>non observé</p> <p>décrit avec <i>Stigonema</i></p>
<i>S. graminosum</i>	 <p>55 µm</p> <p>taille : 45-70 µm coloré</p>	<p>taille : 60-80 µm coloré</p>	 <p>55 µm</p> <p>taille : 42(62,5) x 4,5(11) µm</p>	 <p>30 µm</p> <p>taille : 21(35) x 2,5(3) µm 3-4 septa</p>	 <p>6 µm</p> <p>sphérique Nostoc 5-6 µm</p>
<i>S. vulcani</i>	 <p>70 µm</p> <p>taille : 50-80 µm non coloré</p>	<p>taille : 40-50 µm légèrement coloré</p>	 <p>40 µm</p> <p>taille : 36,5(47) x 7,5(11) µm</p>	 <p>40 µm</p> <p>taille : 30(45) x 2,5(3,5) µm 3-4 septa</p>	<p>non décrit</p> <p>incertain</p>

**Tableau 6. Comparaison des caractéristiques morphologiques de *S. grande*, *S. evolutum*, *S. dactylophyllum***

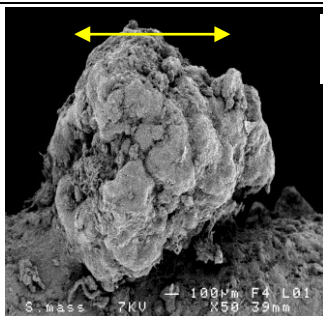
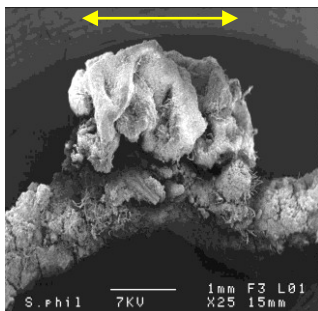
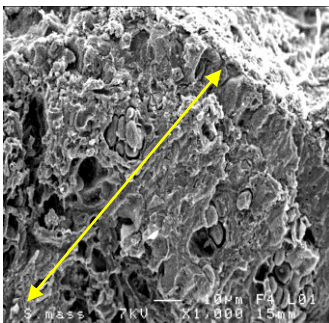
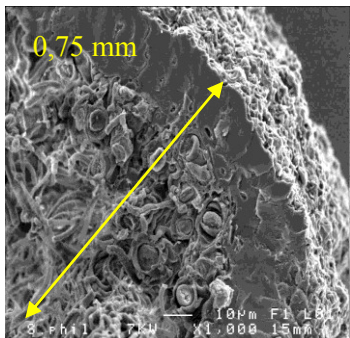
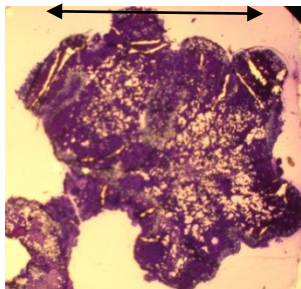
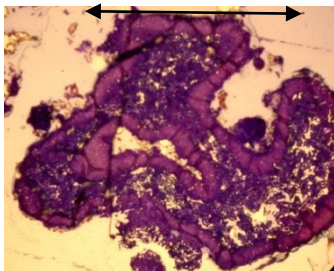
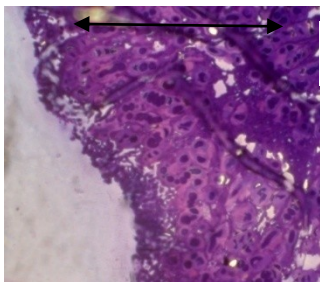
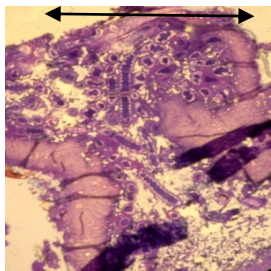
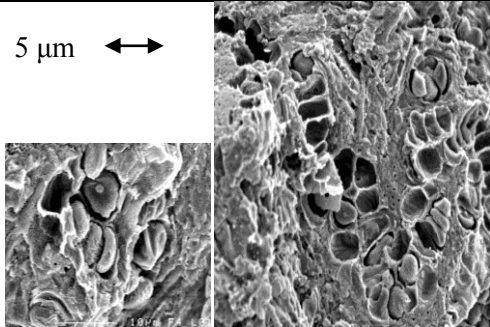
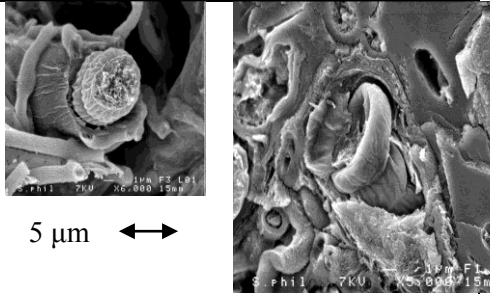
	Hyménium	Hypothécium	Asques	Spores	Cyanobactérie
<i>S. grande</i>	<p>taille : 40-55 <math>\mu\text{m}</math> coloré dans les premiers <math>\mu\text{m}</math></p>	<p>taille : 40-55 <math>\mu\text{m}</math> non coloré</p>	 <p>taille : 30(44) x 7.5(10) <math>\mu\text{m}</math></p>	 <p>taille : 25(40) x 2,5(3) <math>\mu\text{m}</math> 3-4 septa</p>	<p>non observé</p> <p>décrit avec <i>Stigonema</i></p>
<i>S. evolutum</i>	 <p>taille : 55-60 <math>\mu\text{m}</math> non coloré</p>	<p>taille : 50-65 <math>\mu\text{m}</math> non coloré</p>	 <p>taille : 42,5(55) x 7,5(12,5) <math>\mu\text{m}</math></p>	 <p>taille : 16(17) x 5 <math>\mu\text{m}</math> 3-4 septa</p>	<p>non observé</p> <p>décrit avec <i>Stigonema</i></p>
<i>S. dactylophyllum</i>	 <p>taille : 40-60 <math>\mu\text{m}</math> coloré</p>	<p>taille : 20-50 <math>\mu\text{m}</math> non coloré</p>	 <p>taille : 25(45) x 5(10) <math>\mu\text{m}</math></p>	 <p>taille : 13(25) x 3,5(5) <math>\mu\text{m}</math> 3-4 septa</p>	<p>non observé</p> <p>décrit avec <i>Stigonema</i></p>

**Tableau 7. Comparaison des caractéristiques morphologiques de *S. halei*, *S. montagneanum*, *S. scutelligerum***

	Hyménium	Hypothécium	Asques	Spores	Cyanobactérie
<i>S. halei</i>	 <p>taille : 75-100 µm non coloré</p>	<p>taille : 100-110 µm non coloré</p>	 <p>taille : 37,5(40) x 8,25(10) µm</p>	 <p>taille : 26(34) x 3(4) µm 3 septa</p>	 <p>10 µm <i>Scytonema</i></p>
<i>S. montagneanum</i>	 <p>taille : 110-150 µm coloré</p>	<p>75-135 µm non coloré</p>	 <p>taille : 50(85) x 5(10) µm</p>	 <p>taille : 70(90) x 2,5(3) µm 14-17 septa</p>	 <p>10 µm <i>Scytonema</i></p>
<i>S. scutelligerum</i>	 <p>taille : 60-75 µm non coloré</p>	<p>taille : 50-75 µm coloré en brun</p>	 <p>taille : 53(68) x 8(12,5) µm</p>	 <p>taille : 40(43) x 3,5(5) µm 3-4 septa</p>	<p>jamais décrit</p>



**Tableau 8. Observation des céphalodies de *S. halei* et *S. montagneanum* au MEB et sur coupes semi-fines**

	<i>S. halei</i>	<i>S. montagneanum</i>
Aspect général des céphalodies au MEB		
Détail de l'organisation interne de la céphalodie (cassure d'une céphalodie - MEB)		
Coupes longitudinales des céphalodies (coupes semi-fines - 3 µm – coloration au HES)		
Détail du cortex (coupe longitudinale de céphalodie - coupes semi-fines - 1 µm – coloration au HES)		
Détail des cyanobactéries		

## 2.2 Discussion - Conclusion

Les caractéristiques morphologiques obtenues ont été comparées aux données de la bibliographie en s'aidant de leur synonymie (tableau 1). Nous avons ainsi pu consulter les descriptions de Riddle (Riddle 1910), de Dodge (Dodge 1929), de Johnson (Johnson 1938), de Gyelnik (Gyelnik 1931), de Magnusson (Magnusson 1926; Magnusson 1944), de Massart (Massart 1901), de Nylander (Nylander 1860), de Lamb (Lamb 1977) et de Duvigneaud (Duvigneaud 1956). Les deux derniers auteurs étant des spécialistes de l'étude morphologique des Stéréocaulons. Quelques publications plus récentes ont également été utilisées car une de nos espèces *S. graminosum* (Mineta 1984; Huang 2008) a été décrite plus récemment.

L'identification de *S. halei* a été longue et délicate à établir. Les échanges avec le Dr Harrie Sipman (Museum d'Histoire Naturelle à Berlin) ont été particulièrement précieux. En effet, nous avons d'abord identifié *S. halei* comme étant *S. massartianum* mais les observations microscopiques réalisées (aspect des spores, nombre de septa des spores) ne correspondaient pas avec celles de l'Abbé Hue et de Lamb. . En accord avec H Sipman nous avons finalement conclu qu'il s'agissait de l'espèce *S. halei* même si les spores sont légèrement plus grandes (de 40 µm de long contre 35 µm) et l'hyménium plus haut (100-110 µm contre 85 µm maximum). Nous avons comparé nos spécimens récoltés avec ceux présents dans la collection de Des Abbayes (hébergée au sein de notre Equipe de recherche) et qui abrite également une série d'exsiccata de Vezda (fig.24). En 1965, Vezda avait récolté des spécimens de Stéréocaulons en Malaisie qu'il avait identifiés comme étant *S. massartianum* (isotype in VEZDA, Lich. Sel. Exc.Fasc XXVIII (1968) n° 683). En 1976, Lamb rectifie l'identification et conclut qu'il s'agit en fait de *S. halei*. Nos échantillons correspondent morphologiquement à ceux de Vezda. Cette espèce *S. halei* peut être facilement confondue avec *P. pseudomassartianum* mais en diffère d'une part par ses céphalodies moins aplaties, de type sacculé et d'autre part par son contenu chimique (Lamb 1977) différent : *S. pseudomassartianum* contient de l'acide perlatolique et de l'acide anziaïque (non présents dans *S. halei* ou *S. massartianum*).



**Figure 24.** Comparaison de nos échantillons *S. halei* récoltés (spécimen à gauche) avec ceux de l'herbier de Vezda (spécimen à droite)

Les études morphologiques nous ont permis d'obtenir de nombreuses données à partir desquelles nous avons retenu plusieurs critères afin d'essayer de classer nos espèces (tableau 9). Ces critères nous ont été inspirés par l'étude de Johnson (Johnson 1938).

Deux grands types morphologiques se distinguent. Un **premier groupe** (*S. grande*, *S. vesuvianum*, *S. graminosum*, *S. vulcani*, *S. evolutum*, *S. dactylophyllum*) possède un hyménium et un hypothécium  $< 75 \mu\text{m}$ , un nombre de septa  $< 4$ , des céphalodies de type sphérique, des phylloclades granuliformes, peltées, digitées, coralloïdes, des spores plutôt  $< 40 \mu\text{m}$ . Le **deuxième groupe** (*S. halei*, *S. montagneanum*) est caractérisé par des espèces possédant des branches phyllocladioïdes, un hyménium et un hypothécium  $> 75 \mu\text{m}$ . Une espèce semble être plus difficile à classer, *S. scutelligerum* car elle possède des caractéristiques intermédiaires. Plusieurs critères qui avaient été pris en compte initialement comme le type d'apothécie, leur taille, le genre de cyanobactérie retrouvée dans les céphalodies, ne semblent pas suivre cette même classification.

*S. scutelligerum* est une espèce qui a divisé Lamb et DuVigneaud (leurs classifications respectives figurent en annexe 4). Avant 1956, chaque auteur divisait le genre *Stereocaulon* en 2 groupes :

- ceux qui possèdent des phylloclades archaïques dites « vraies » selon DuVigneaud c'est-à-dire ayant une organisation de l'algue selon une orientation dorsiventrale. Ils

faisaient alors partie du sous-genre *Platycladium* pour Duvigneaud et *Enteropodium* pour Lamb.

- ceux qui possèdent des ramules phyllocladioïdes pour Duvigneaud et qui ont une organisation radiaire. Ils faisaient partie du sous-genre *Cylindrocladium* pour Duvigneaud et *Holostelidium* pour Lamb.

En 1951, Lamb classe *S. scutelligerum* du fait de l'aspect extérieur de ses phylloclades cylindriques dans le sous-genre *Holostelidium* section *Ecephalodia* (c'est-à-dire sans céphalodies) mais Duvigneaud considère qu'il n'en est rien et qu'en section transversale, il est possible de voir que les phylloclades possèdent une organisation dorsiventrale (de façon identique à *S. exutum* fig.25 tirée de (Duvigneaud 1956) même s'il semble que les branches couvertes de phylloclades aient une allure de branche phyllocladioïde. En 1977, Lamb revoit sa classification systématique des Stéréocaulons, rectifie et donne raison à Duvigneaud en classant alors cette espèce dans le sous-genre *Enteropodium* section *Denudata* subsection *Denudata*. Ainsi, *S. scutelligerum* appartiendrait à l'ex-sous-genre *Enteropodium* (actuel sous-genre Stéréocaulon) et ses caractéristiques morphologiques devraient ainsi rapprocher cette espèce du premier groupe (annexe 4).



Fig. 11. — Coupe transversale d'une phylloclade de *Stereocaulon exutum* NYL.  
(Japon, Yokoska, ONO et SAVATIER, n° 546).  
Nette structure dorsiventrale.

**Figure 25. Organisation dorsiventrale de la phylloclade radiaire de *S. exutum***



**Tableau 9. Comparaison des critères microscopiques des 9 espèces de Stéréocaulon récoltées**

	Hyménium		Hypothécium		Taille des spores		Nombre de septa		Céphalodies		Phylloclade	Apothécies		
	< 75 µm	>100 µm	<75 µm	>75 µm	<40 µm	>40 µm	<4	>4	type	cyanob actérie	type	type	taille <0.9 mm	taille > 0.95 mm
<i>S. vesuvianum</i>	x		x		x		x	x	sph	ST	pel	leca	x	
<i>S. graminosum</i>	x		x		x		x		sph	NOS	gran / pel	leci		x
<i>S. vulcani</i>	x		x		x	x	x		-	-	gran / pel	leca	x	
<i>S. scutelligerum</i>	x	x	x		x	x	x		-	-	gran / cor	leca	x	
<i>S. grande</i>	x		x		x	x	x		sph	ST	cor	leca		x
<i>S. evolutum</i>	x		x		x		x		sph	ST	cor / dig / papi	leci		x
<i>S. dactylophyllum</i>	x		x		x		x		sph	ST	cor / dig / gran	leci		x
<i>S. halei</i>		x		x	x	x	x		scr	SCY	br.phy.	leci	x	
<i>S. montaganeanum</i>		x		x		x		x	scr	SCY	br.phy.	leci		x

sph : sphérique ; scr : scrobiculée ; ST : Stigonéma ; SCY : Scytonéma ; NOS : Nostoc ; cor : coralloïde ; gran : granuliforme ; dig : digité ; papi : papilliforme ; pel : peltée ;  
br.phy : branches phyllocladioïques ; lécanoroïde : leca ; lécideoïde : leci



---

### 3 Etude phylogénétique

(Collaboration avec Dr Annie GUILLER, UMR CNRS 6553 - Equipe SCA, Université Rennes 1)

Jusqu'à présent fondée sur la comparaison de caractères morphologiques, la systématique phylogénétique des *Stereocaulon* est ici complétée par la variation de séquences nucléotidiques. Cette approche complémentaire a pour objectif de valider et de résoudre certaines interrogations quant au degré d'apparentement précédemment établi sur des critères de ressemblance morphologique et d'affinités supposées entre espèces. Les relations phylogénétiques établies permettront en outre d'apporter des informations sur l'histoire évolutive des *Stereocaulon* et en particulier sur les neuf espèces décrites ci-dessus.

#### 3.1 Mode opératoire

##### *De l'extraction d'ADN au séquençage*

Pour chaque espèce de Stéréocaulon, de un à trois spécimens sont sélectionnés puis broyés dans un mortier (cf partie expérimentale sec. 3.5). L'ADN total est extrait grâce à l'utilisation du kit DNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) selon le protocole décrit par le fabricant. Un fragment d'une unité répétée de l'ADN ribosomique nucléaire est utilisé pour analyser les variations interspécifiques. Cette unité de transcription est composée de gènes conservés codant pour des ARN ribosomiques (ARNr) et des régions intergéniques plus variables, dont celle de l'espaceur intergénique transcrit, l'ITS. Cette région ITS, conservée au niveau intra-spécifique et variable entre espèces, contient le gène 5.8S encadré par l'ITS1 et l'ITS2. La région (ITS1-5.8S-ITS2) est amplifiée par PCR en utilisant après test préliminaire le couple d'amorces ITS4-F et ITS5-R (White, Bruns et al. 1990). L'amplification est contrôlée par migration sur gel d'électrophorèse (agarose 2%, tampon TBE 0,5X). Le séquençage double-brin des produits de PCR bruts est réalisé par la plateforme de Séquençage ADN et Génotypage (IFR26, Nantes). Les relations phylogénétiques entre espèces de *Stereocaulon* sont établies à partir des séquences produites, complétées par celles disponibles dans la base de données Genbank (Högnabba 2006). Hognabba (2006) a effectivement réalisé une étude phylogénétique portant sur 101 spécimens de Stéréocaulons issus de 49 espèces différentes. Une analyse préliminaire nous a permis de cibler les séquences à retenir pour notre étude.

Ainsi, une seule séquence par taxon est sélectionnée sauf dans le cas de variation nucléotidique intraspécifique quelle que soit l'origine géographique des individus considérés. Nous avons utilisé 53 séquences ITS parmi les 98 séquences déposées. Trois espèces du taxon *Cladonia* dont les séquences ont également été obtenues à partir de la GenBank ont été choisies comme *outgroup*, point d'ancrage pour la vérification de l'analyse.

### *Analyse phylogénétique*

La reconstruction d'arbres établissant les relations phylogénétiques entre les haplotypes ITS de *Stereocaulon* sp est fondée sur le modèle d'inférence bayésienne utilisant le logiciel MrBAYES v3.1.1 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Cette approche, basée sur la distribution des probabilités postérieures des arbres, est la probabilité d'obtenir un arbre selon les données. Dans la mesure où la distribution des probabilités postérieures des arbres est impossible à calculer, MrBAYES utilise une technique de simulation appelée Markov Chain Monte Carlo (MCMC) pour approximer ces probabilités. Les séquences ont été alignées avec le logiciel CodonCode Aligner (CodonCode Co., USA). Le modèle de substitutions nucléotidiques correspondant le mieux aux séquences « *Stereocaulon* sp » a été choisi au moyen du logiciel MrAIC v1.4.2 (Nylander, Ronquist et al. 2004). Ce programme calcule des scores de vraisemblance du jeu de données sous 24 modèles de substitution puis compare et classe les critères d'Akaike (AIC, AICc, BIC) correspondants à chacun des modèles testés. Le modèle optimal retenu pour la région analysée du gène ITS1-5.8S-ITS2 est le modèle symétrique *SYMG* (SYM : modèle avec fréquences nucléotidiques identiques mais 6 taux de substitution différents (Zharkikh 1994): taux de substitution différents pour chaque site distribués selon une loi gamma).

### *3.2 Résultats*

Sur les 19 spécimens analysés (trois spécimens pour *S. graminosum*, *S. montagneanum*, *S. halei*, *S. vesuvianum* ; deux spécimens pour *S. scutelligerum*, *S. vulcani* ; un spécimen pour *S. dactylophyllum*, *S. grande*, *S. evolutum*), seules 14 séquences issues de huit espèces distinctes ont pu être exploitées. Aucune séquence représentative de *S. graminosum* n'a pu malheureusement être interprétée. L'alignement multiple des séquences produites et récupérées de la Genbank a permis la construction d'une matrice de 380 pb, avec des séquences montrant d'importantes variations de longueur puisque le fragment varie de 342 à 361 pb. La topologie de l'arbre phylogénétique obtenu par inférence bayésienne montre que le

genre *Stereocaulon* forme un groupe monophylétique. Au sein de ce groupe présentant de nombreuses polytomies, six clades distincts apparaissent (clades I<sub>A</sub> à I<sub>F</sub>, figure 26). Avec une faible probabilité postérieure, le clade I<sub>A</sub> isole les espèces du sous-genre *Holostelidium*. Ce clade se scinde en deux groupes, celui caractérisant la sous-section des *Aciculisporae* dont font partie les trois spécimens de l'espèce *S. halei* (sous-clade IIa), et celui isolant les trois spécimens de l'espèce *S. montagneanum* (sous-clade IIb) classée dans la sous-section des *Holostelidium*, auxquels se rattache le représentant de l'espèce *S. cumulatum*. Le clade I<sub>F</sub> regroupe des espèces morphologiquement distinctes puisque qu'elles appartiennent à la section des *Stereocaulon*, des *Lobophoron*, des *Denudata*, des *Botryoideum* ou des *Stereocladium*. Il comprend 28 des 66 espèces considérées dont celles que nous avons amplifiées, en l'occurrence *S. evolutum*, qui ne montre aucune variation avec le spécimen issu de la Genbank (*S. evolutum*22), *S. vesuvianum* et *S. grande*. La polyphylie du groupe intégrant *S. grande* signe une divergence génétique intraspécifique plus forte que celle mesurée au niveau interspécifique. En effet, *S. grande* partage la même séquence que celle caractérisant un individu récolté en Autriche et un individu récolté en Italie *S. alpinum*, les deux autres individus de *S. alpinum* considérés et originaires d'Argentine formant alors un groupe frère. De la même façon, d'importantes variations intraspécifiques concernent *S. vesuvianum* puisque la séquence issue de la genbank (*S. vesuvianum*25) est plus proche de *S. verruciferum* (*S. verruciferum*99) que de celle produite. Les cinq autres séquences obtenues définissent deux clades, le clade I<sub>B</sub> regroupe les trois individus séquencés des espèces *S. dactylophyllum* et *S. scutelligerum*, et le clade I<sub>E</sub> isole deux des individus séquencés de *S. vulcani*.

### 3.3 Discussion

Ces résultats ont été comparés avec ceux obtenus par Hognabba (Högnabba 2006). Ce dernier a basé son étude sur l'amplification des gènes 5.8S encadré par l'ITS1 et l'ITS2 (avec utilisation du couple d'amorces ITS1-F, ITS5 et ITS4) ainsi que sur une portion du gène codant pour la  $\beta$ -tubuline (avec utilisation des amorces Bt3-LM et Bt10-LM). Les analyses des données moléculaires ont été réalisées par la méthode de parsimonie par optimisation directe. Les séquences des deux gènes 5.8S et de la  $\beta$ -tubuline ont été compilées et les données obtenues à partir des différentes espèces ont été analysées sans alignement des séquences. Cette opération a été réalisée grâce au logiciel POY (Gladstein and Wheeler 1997).

La solidité de chacun des nœuds de l'arbre consensus obtenu a été testée au moyen du calcul de l'indice de Bremer (Bremer and Thulin 1998). Les données des séquences des régions ITS1-5.8S-ITS2 n'ont pas été obtenues pour 15 espèces et il ne nous a pas été alors permis d'inclure ces espèces dans l'arbre phylogénétique.

Alors que cela n'avait pas pu être mis en évidence par Hognabba dans son étude de 2006, les représentants du sous-genre *Holostelidium* constituent sur notre arbre un groupe monophylétique. L'absence de séquence ITS déposée dans la Genbank pour *S. sorediiferum* ne permet pas de vérifier la monophylie des espèces de la sous-section *Holostelidium*, représentée par nos trois spécimens de *S. montagneanum*. En revanche, *S. halei* se lie au cinq autres espèces caractéristiques de la sous-section *Aciculisporae* en formant un clade bien distinct. De la même façon qu'Hognabba (2006), nous retrouvons des clades regroupant les mêmes espèces en l'occurrence celui caractérisant la section *Lobophoron*, celui isolant les espèces « crustacées », ainsi que ceux séparant les espèces du sous-genre *Stereocaulon*, section *Denudata*, sous-section *Denudata* versus sous-section *Botryoideum* (Figure 26).

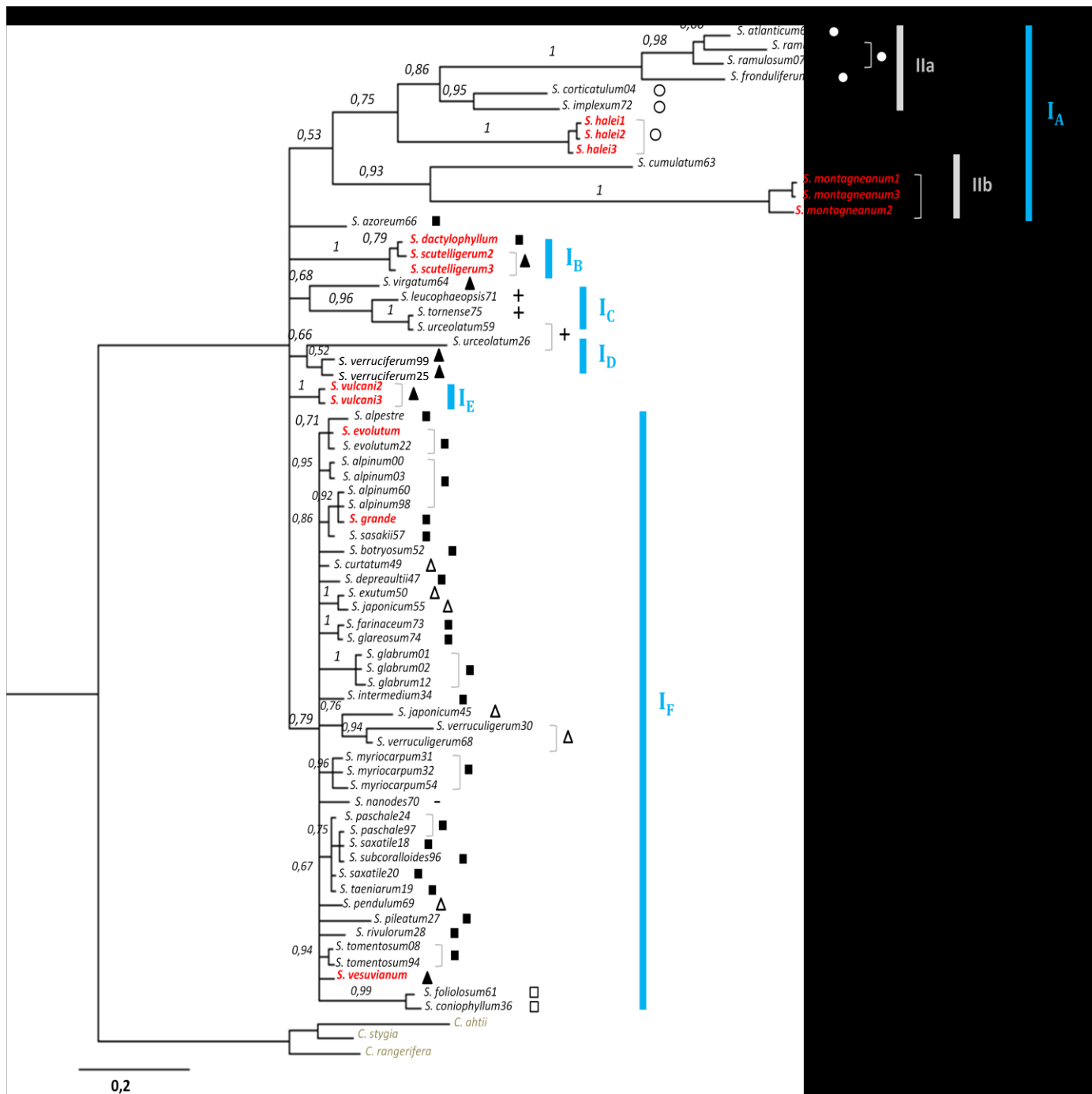


Figure 26. Relations phylogénétiques entre les individus des espèces de *Stereocaulon* fondées sur la variation du gène nucléaire ITS (486 pb) : arbre de consensus majoritaire (50 %) des arbres échantillonnés par l'analyse bayésienne (*C. rang/C. stygia/C. ahtii* = « outgroup »). Les espèces ci-dessus qui figurent en rouge/gras sont celles dont l'ADN a été séquençé.

Les espèces ont été ensuite étudiées pour leur contenu chimique à l'aide des réactions thallines couramment employées en lichénologie et des précisions ont été apportées par l'analyse de profils chromatographiques suite à une extraction aqueuse et méthanolique.

---

## 4 Etude chimique (analyses et caractérisations)

### 4.1 Par les réactions thallines

Des réactions colorées appliquées sur le thalle (médulle ou cortex ou extrait acétonique du lichen appliqué sur papier filtre) sont également utilisées depuis 1860 en lichénologie pour aider à la caractérisation d'espèces lichéniques : ce sont les réactions thallines. Quatre tests sont couramment utilisés appelés K, C, KC et Pd (ou PA)

K correspond à une solution de potasse à 10% dans l'eau

C est une solution d'hypochlorite de potassium ou calcium (eau de Javel)

KC correspond à l'application d'une solution de K suivie d'une solution de C

Pd correspond à une solution of para-phénylènediamine.

On note pour l'ajout de K, K<sup>+</sup> suivie de la couleur observée si la réaction est positive ou K<sup>-</sup> si aucune couleur n'est apparue. L'apparition de la couleur est due à la présence de composés chimiques majoritaires dans le lichen et l'intensité de la couleur est corrélée à la quantité du ou des composé(s) réagissant avec le réactif.




Toutes ces réactions (applications directes sur le thalle) ont été réalisées sur les 9 espèces de *Stereocaulon* et les résultats figurent dans le tableau 10. On remarque que tous les stéréocaulons présentent une réaction avec la potasse (K) et la paraphénylènediamine (Pd) de couleur jaune voire orange et il est admis que cette réaction est due à l'atranorine. On peut néanmoins noter que d'autres composés lichéniques comme l'acide stictique, l'acide thamnolique peuvent également donner cette même couleur. Aucun des stéréocaulons ne réagit avec l'eau de javel (C<sup>-</sup>).

Les espèces du groupe 1 sont toutes Pd<sup>+</sup> orange, K<sup>+</sup> jaune mais cela n'est pas discriminant par rapport à 2 espèces du groupe 2 qui donnent des réactions identiques.

Les espèces du groupe 3 donnent des colorations jaunes (ou jaune orangée) pour ces deux réactifs et *S. scutelligerum* présente une réaction singulière orange-rouge lors de l'application successive de ces 2 réactifs. *S. evolutum* est aussi aisément distingué des autres espèces par la coloration KC<sup>+</sup> jaune obtenue de la même façon. Cette différence est très utile

pour le distinguer de *S. dactylophyllum* dont il partage souvent le même biotope. On notera aussi la nuance de coloration Pd+ qui est plus orangée pour *S. dactylophyllum*.

**Tableau 10. Réactions thallines des neuf espèces de Stéréocaulons (Gr 1 en vert, Gr 2 en bleu, Gr3 en rouge)**

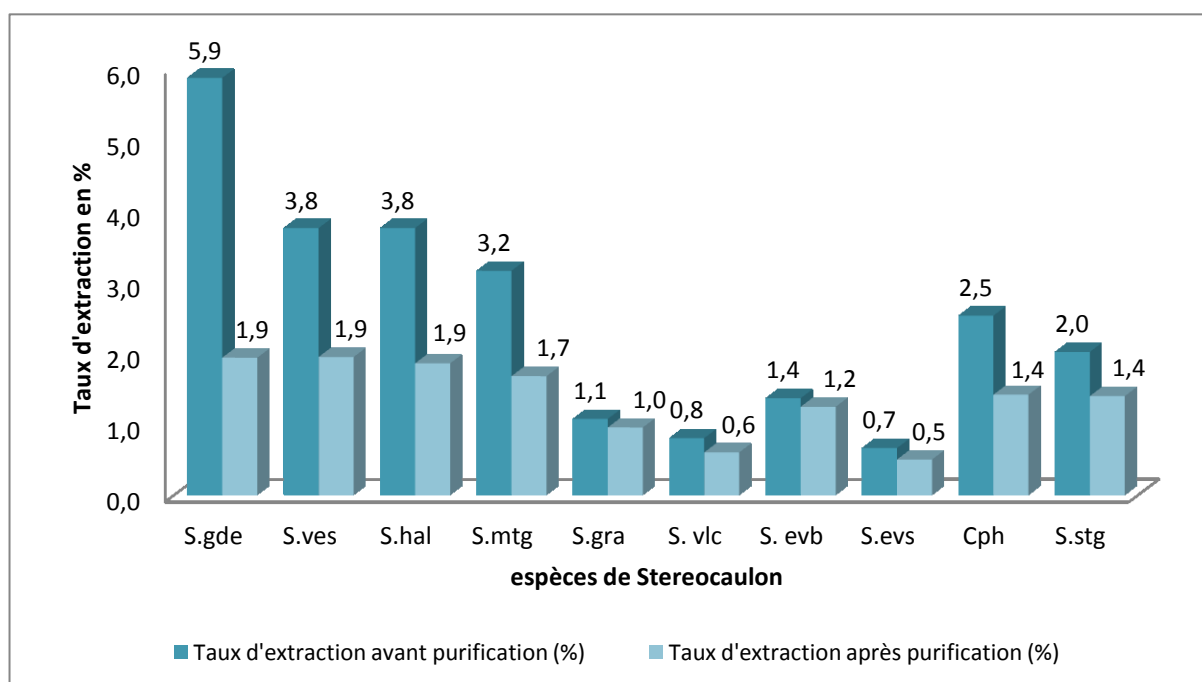
Lichen	Pd	K	C	KC
<i>S. dactylophyllum</i>				
<i>S. evolutum</i>				
<i>S. grande</i>				
<i>S. graminosum</i>				
<i>S. vesuvianum</i>				
<i>S. vulcani</i>				
<i>S. scutelligerum</i>				
<i>S. halei</i>				
<i>S. montagneanum</i>				

## 4.2 Préparation des extraits à partir des thalles de stéréocaulons

Pour apprécier le contenu en métabolites secondaires de chaque espèce de Stéréocaulon et les comparer, des extraits organiques et aqueux ont été réalisés. Pour chaque lichen, une extraction aqueuse à froid sur 100 mg de lichens suivie de deux extractions méthanoliques ont été conduites (partie expérimentale sec. 3.1.1).

### 4.2.1 Extraction aqueuse

A la différence des extraits méthanoliques, les extraits aqueux ont subi après l'extraction une étape de purification sur résine échangeuse d'ions DOWEX (partie expérimentale ) selon le protocole mis au point dans le Laboratoire (Roullier, Chollet-Krugler et al. 2011) afin d'obtenir des fractions riches en composés azotés tels que des mycosporines.



**Figure 27. Taux d'extraction obtenus après extraction aqueuse à partir de 100 mg de lichens**

S. gde : *Stereocaulon grande*, S. dac : *Stereocaulon dactylophyllum*, S.ves : *Stereocaulon vesuvianum*, S. hal : *Stereocaulon halei*, S. mtg : *Stereocaulon montagneanum*, S. gra : *Stereocaulon graminosum*, S. vlc : *Stereocaulon vulcani*, S. evb : *Stereocaulon evolutum* bis apothécies, S. evs : *Stereocaulon evolutum* sans apothécies, Cph: Céphalodies de *S. montagneanum*, S. stg: *Stereocaulon scutelligerum*.

Des écarts quantitatifs importants pour cette extraction aqueuse (taux d'extraction de *S. grande* 8 fois plus important que celui de *S. vulcani*) montrent que les contenus en composés polaires sont très variables selon les espèces de stéréocaulons (fig. 27). Au sein d'une même espèce des écarts du simple au double sont aussi visibles selon que *S. evolutum* est fructifié (S. evb; 1,4%) ou non (S. evs ; 0,7%). Le lichen *S. grande* se distingue des autres par un taux d'extraction élevé avant purification (> 5%). Les lichens *S. vesuvianum*, *S. halei*, *S. montagneanum*, céphalodies de *S. montagneanum* et *S. scutelligerum* présentent un taux d'extraction compris entre 2 – 3.5%. Les quatre lichens restants (*S. dactylophyllum*, *S. graminosum*, *S. vulcani*, *S. evolutum* avec ou sans apothécies) ont un taux d'extraction faible (0.5 – 1.2%). Après purification, on observe une diminution importante de la quantité de matière et ce, d'autant plus forte que le taux d'extraction initial était grand. Ces composés initialement extraits en quantité sont vraisemblablement des polyols ou des sucres.

Excepté pour *S. dactylophyllum*, ces 10 extraits ont été ensuite analysés en utilisant plusieurs techniques : HPTLC-UV, HPLC-DAD, HPLC-MS.



#### 4.2.2 Extraction méthanolique

Deux extractions méthanoliques successives ont été conduites sur les thalles initialement épuisés par l'eau puis séchés (cf partie expérimentale sec. 3.1.2).

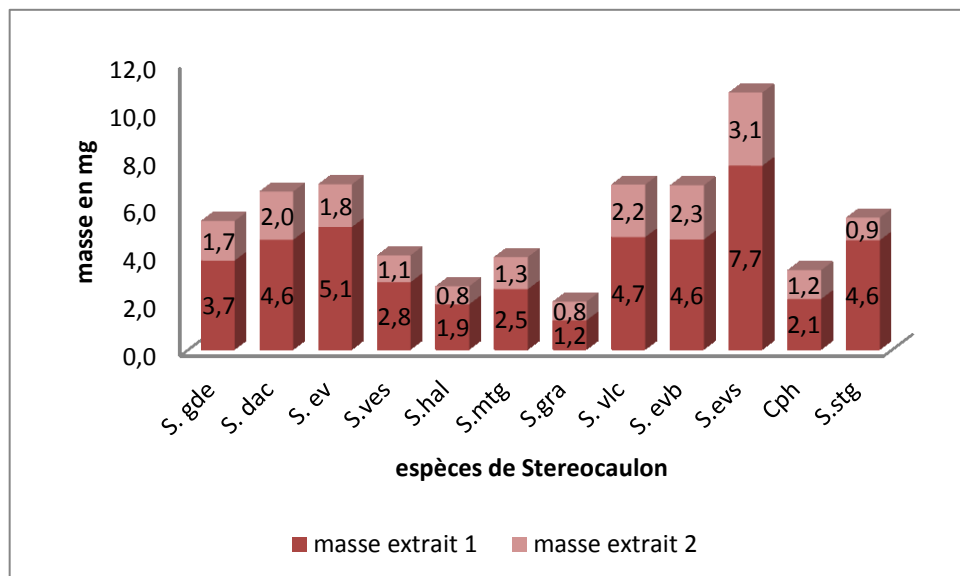


Figure 28. Bilan des masses d'extraits obtenus après les deux extractions méthanoliques successives à partir de 100 mg de départ de lichens au départ

S.gde : *Stereocaulon grande*, S.ves : *Stereocaulon vesuvianum*, S. hal : *Stereocaulon halei*, S. mtg : *Stereocaulon montagneanum*, S. gra : *Stereocaulon graminosum*, S. vlc : *Stereocaulon vulcani*, S. evb : *Stereocaulon evolutum* bis apothécies, S. evs : *Stereocaulon evolutum* sans apothecia, Cph: Céphalodies de *S. montagneanum*, S. stg: *Stereocaulon scutelligerum*

Les taux d'extraction moyens en composés résiduels extractibles par un solvant organique polaire comme le méthanol sont plus élevés (2 à 11%) que les taux moyens obtenus par la primo-extraction aqueuse (0,7 à 6%) (fig. 28).

Le taux d'extraction diminue significativement entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> extraction excepté pour *S. grande* et *S. evolutum* où il semble que 2 extractions soient insuffisantes pour extraire l'ensemble des composés.

### 4.3 Analyses par HPTLC-UV

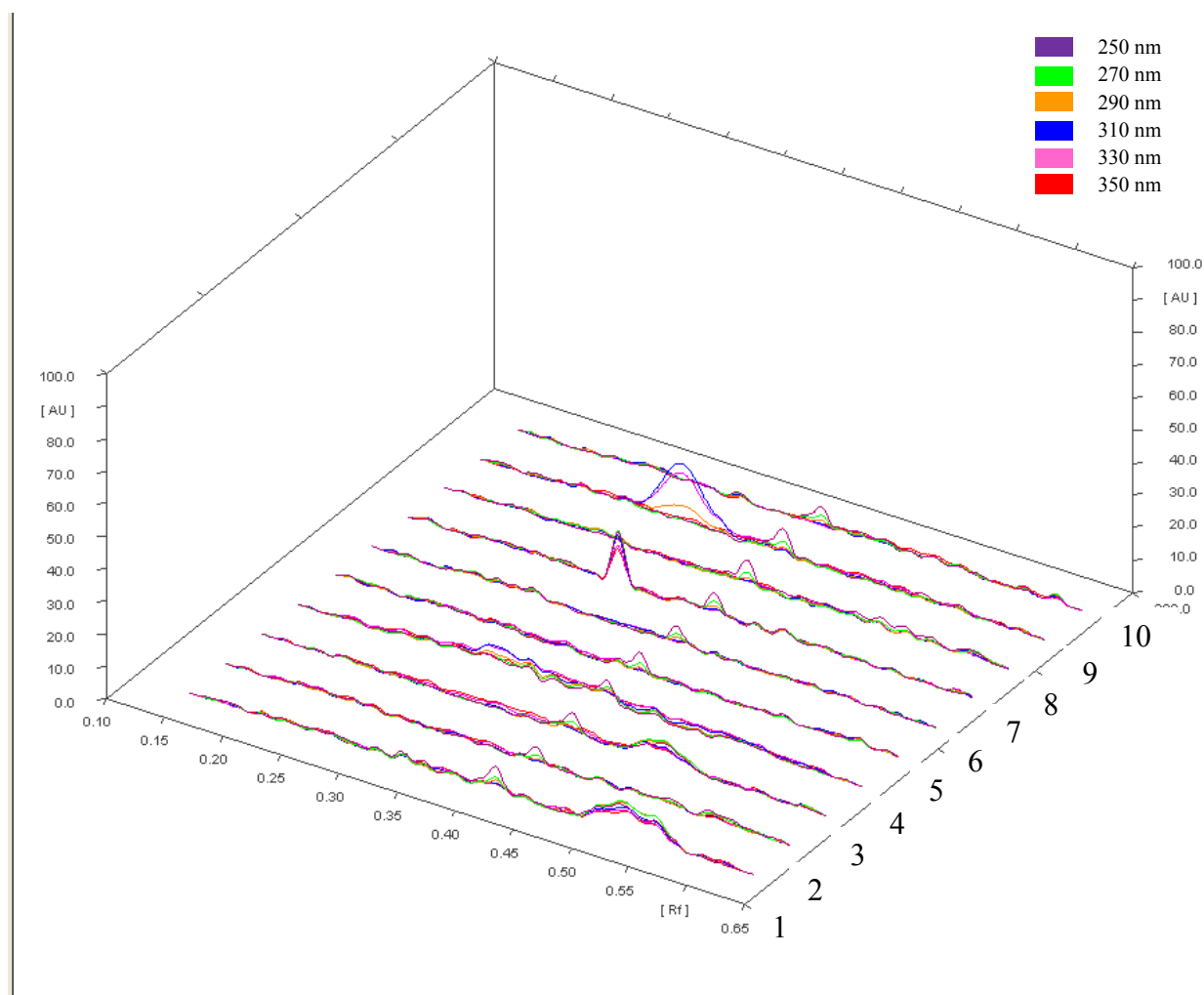
#### 4.3.1 Extraits aqueux

Chaque extrait aqueux semi-purifié est repris par 500  $\mu\text{L}$  d'eau ultra-pure puis déposé et analysé par un ensemble d'appareillages de type CAMAG : 40  $\mu\text{l}$  de chaque extrait sont déposés (Automatic TLC sampler III) sur plaque de silice HPTLC, mis à migrer dans la cuve automatique (ADC2 Camag), séchée sur la plaque chauffante puis scannée à 6 longueurs d'onde différentes (220, 250, 280, 310, 340, 370 nm). La concentration des 10 échantillons n'est pas identique (cf partie expérimentale sec. 3.1.1.2) et cette analyse est purement qualitative.

L'échantillon aqueux de *S. dactylophyllum* n'a pas été déposé sur CCM car il a été récolté dans un deuxième temps et nous avons préféré le réserver pour une analyse HPLC / MS au laboratoire de Graz (Pr Bauer).

On s'aperçoit qu'un composé possédant une absorbance maximale à 250 nm et dont le  $R_f = 0.40$  est présent dans toutes les espèces de *Stereocaulon*. Il pourrait ainsi se révéler être un marqueur de ce genre. On observe aussi la présence de certains composés signant des profils propres pour chacune des espèces (fig. 29) bien que les profils ne soient pas très marqués pour , **2-** *S. vesuvianum*, **5-** *S. graminosum*, **6-** *S. vulcani*, , **8-** *S. evolutum sans apothécies* ,et **10-** *S. scutelligerum*.

Si l'on compare la piste 4 (*S. montagneanum*) et la piste numéro 9 (*S. montagneanum céphalodies*) un signal ( $R_f = 0.32$ ,  $\lambda_{\text{max}}$  310, 330nm) est considérablement plus marqué dans l'échantillonnage correspondant aux céphalodies. Ce signal est large (0.27-0.37) (Figure 29) et pourrait correspondre à l'addition des absorbances de plusieurs composés de type mycosporine qui sont caractérisés en UV par des signaux très symétriques centrés sur 310 nm (oxomycosporines) ou 330 nm (iminomycosporines) (une légère déformation du pic est d'ailleurs visible). Sur la piste numéro 4 (*S. montagneanum*), on retrouve 2 pics ( $R_f=0.32$  et 0.36) absorbant préférentiellement à 310 nm et 3 pics ( $R_f=0.34$  ; 0.38 ; 0.43) absorbant préférentiellement à 330 nm. De même, sur la piste numéro 3 *S. halei*, on retrouve 3 pics dont un ( $R_f = 0.50$ ) possède une absorption spécifique à 310 nm.



**Figure 29. Allure générale de l'analyse par spectrodensitométrie des 10 extraits aqueux des 9 stéréocaulons**

1- *S. grande*, 2- *S. vesuvianum*, 3- *S. halei*, 4- *S. montagneanum*, 5- *S. graminosum*, 6- *S. vulcani*, 7- *S. evolutum* bis apothécies, 8- *S. evolutum* sans apothécies, 9- Céphalodies *S. montagneanum*, 10- *S. scutelligerum*

On retrouve ensuite pour l'espèce *S. grande* (piste numéro 3) et *S. evolutum* avec apothécies (piste numéro 7), des signaux qui ne possèdent pas les longueurs d'onde caractéristiques des mycosporines et absorbent à toutes les longueurs d'onde mais préférentiellement à  $\lambda = 270$  nm.

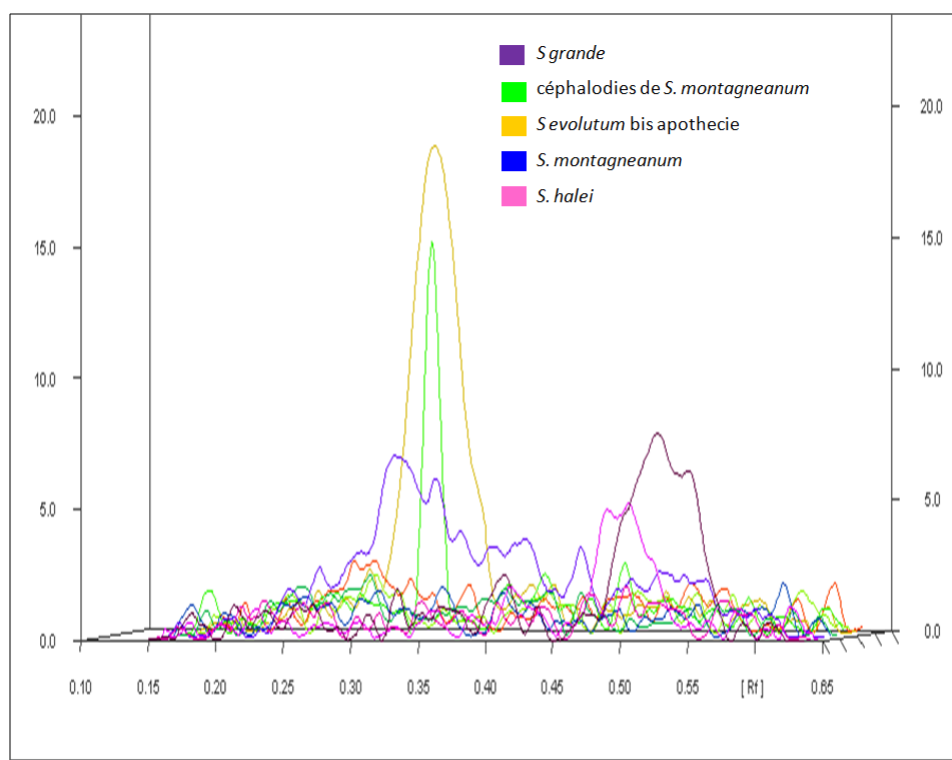


Figure 30. Absorption spécifique à 310 nm de *S. evolutum* avec apothécies, *S. montagneanum* et *S. halei*

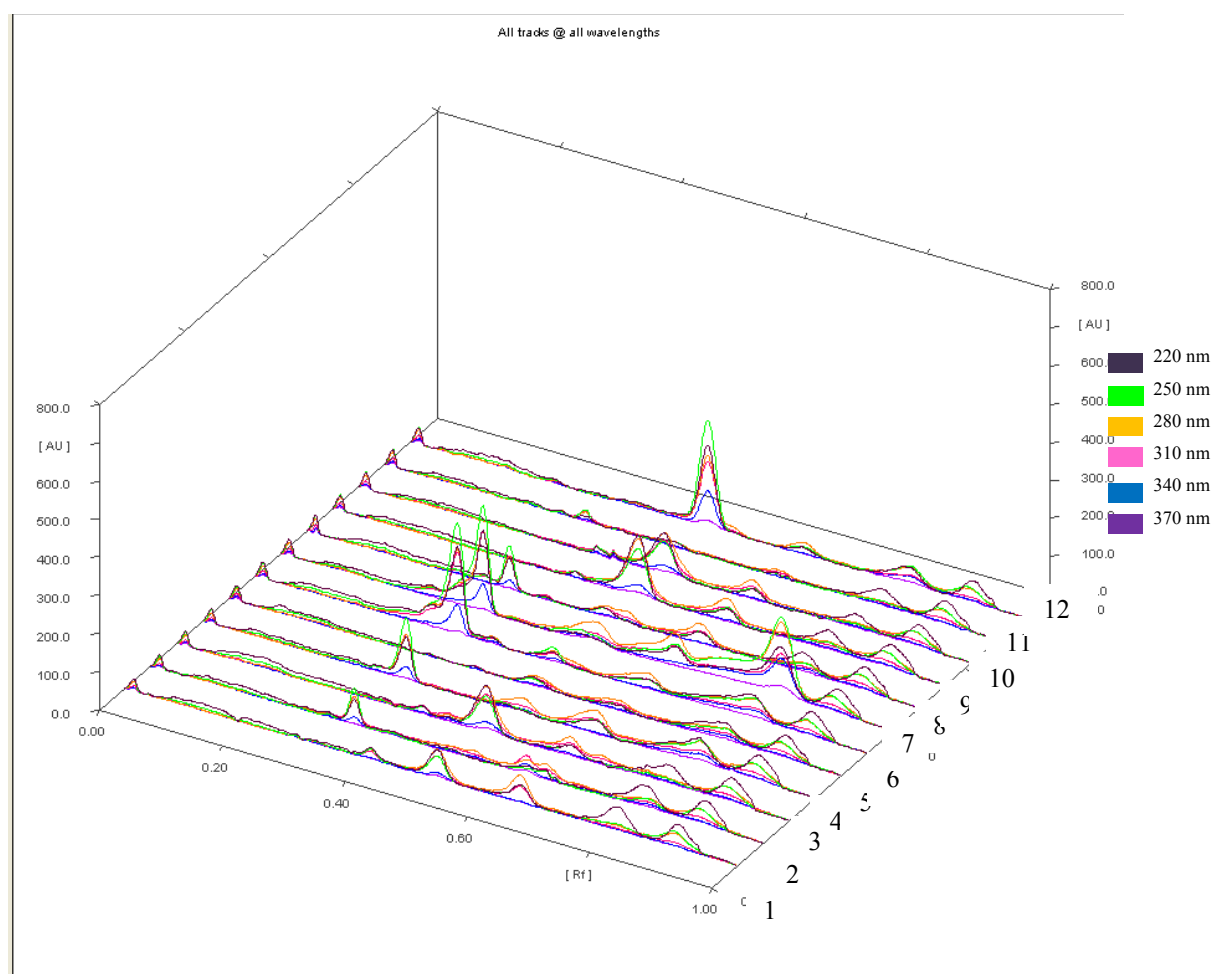
Ainsi *S. montagneanum* posséderait potentiellement 5 mycosporines dont deux seraient présentes dans les céphalodies. *S. halei*, autre lichen possédant des céphalodies, posséderait également une mycosporine tandis que pour les autres espèces, aucun composé avec ces absorptions spécifiques n'est retrouvé.

#### 4.3.2 Extraits méthanoliques

Les extraits méthanoliques sont repris dans du méthanol pour atteindre une concentration de 1 mg/ml. Les solutions sont filtrées et transposées dans des cupules avec réducteurs. De la même manière que précédemment, on réalise le dépôt (20  $\mu$ L) des échantillons, le développement et l'analyse (cf partie expérimentale sec. 3.2.2). Dans un deuxième temps, la plaque est observée à 254 et 365 nm puis révélée par le réactif ANS = anisaldéhyde sulfurique + chauffage à 120°C.

Par rapport aux extraits aqueux, un autre extrait méthanolique traité dans les mêmes conditions a été ajouté au criblage : il s'agit d'un nouvel échantillon de *S. evolutum* ramassé lors d'une nouvelle récolte (nov 2011) à St Just (Ille et Vilaine) appelé *S. evolutum*.

L'analyse des extraits permet de mettre en évidence un profil plus complexe que celui des extraits aqueux. On obtient 7-8 spots en moyenne pour chaque extrait avec un minimum pour *S. vesuvianum* qui laisse apparaître 6 spots et un maximum pour *S. dactylophyllum* avec 11 spots (fig. 31). Parallèlement, certains composés présents dans les Stéréocaulons (tableau 25 en annexe) ont été déposés comme l'ac. stictique, l'ac. norstictique, l'ac. lobarique, l'ac. salazinique, le MOC et l'atranorine. Toutes les CCM ont ensuite été révélées par l'anisaldéhyde sulfurique (ANS) ce qui a permis de mieux préciser en fonction des couleurs des spots obtenus, la comparaison des profils, voire l'identité de certains composés.



**Figure 31. Analyse par spectrophotodensitométrie des 12 extraits méthanoliques**

1-*S. grande*, 2-*S. dactylophyllum*, 3-*S. evolutum*, 4-*S. vesuvianum*, 5-*S. halei*, 6-*S. montagneanum*, 7-*S. graminosum*, 8-*S. vulcani*, 9-*S. evolutum bis apothécies*, 10- *S. evolutum sans apothécie*, 11-*Céphalodies S. montagneanum*, 12- *S. scutelligerum*

Certains signaux sont retrouvés systématiquement dans toutes les espèces de Stéréocaulons, notamment les composés dont le Rf = 0.64 et 0.80 (atranorine et MOC respectivement). Ces deux composés ne sont pas discriminants et le MOC est une sous-structure résultant de l'hydrolyse de l'atranorine. Le tableau 11 permet de donner une allure générale du profil phytochimique des composés majoritaires de chaque Stéréocaulon. Deux

profils semblent se dégager sur la base de la présence de deux depsidones, l'acide lobarique ou l'acide stictique :

- **Profil 1 = espèces contenant de l'acide lobarique:** *S. evolutum*, *S. grande*, *S. halei*.
- **Profil 2= espèces contenant de l'acide stictique:** *S. dactylophyllum*, *S. graminosum*, *S. montagneanum*, *S. vesuvianum*, *S. vulcani*..(+ *S. scutelligerum*, ac norstictique)

**Tableau 11. Récapitulatif des composés présents dans les extraits méthanoliques des 9 Stéréocaulons après analyse HPTLC-UV**

Rf	UV	ANS	Cposé	gde	ev	evb	evs	hal	ves	dac	mtg	vlc	gra	sct	cph
0,23	220													x	
0,25	220-280										x	x	x		
0,26	220					x									
0,29	280									x	x	x			
0,33	280-310-340	orange	STC						x	x	x	x	x		
0,35	220													x	
0,36	220				x										
0,39	280										x				
0,39-0,4	280-310			x	x	x	x								
0,42	310-280						x								
0,44	310-280				x										
0,48-49	280-310	jaune	NSTC									x	x	x	
0,5-051	280-310-340	marron	LOB	x	x	x	x	x							
0,52-0,53	280								x	x		x	x		
0,62	280									x					
0,63	220-250							x							
0,64-0,65	280-310	rouge	MOC	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
0,66	220									x					
0,69	280				x										
0,73	280				x										
0,74	220					x									
0,77	310-340								x						
0,77	220				x										
0,8-0,82	220-280	rouge	ATRA	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

STC : acide stictique, NSTC : acide norstictique, LOB : acide lobarique, MOC : méthyl- $\beta$ -orcinol-carboxylate, ATRA : atranorine. Les couleurs indiquées correspondent aux colorations obtenues après révélation par l'ANS : solution d'anisaldéhyde sulfurique - gde : *Stereocaulon grande*, ves : *Stereocaulon vesuvianum*, hal : *Stereocaulon halei*, mtg : *Stereocaulon montagneanum*, gram : *Stereocaulon graminosum*, vlc : *Stereocaulon vulcani*, evb : *Stereocaulon evolutum* bis apothécies, evs : *Stereocaulon evolutum* sans apothecie, Cph : Céphalodies de *S. montagneanum*, stg : *Stereocaulon scutelligerum*

#### 4.4 Analyses par HPLC-DAD

Ces mêmes extraits ont été également analysés par HPLC couplée à un détecteur à barrette de diodes (DAD).

##### 4.4.1 Extraits aqueux

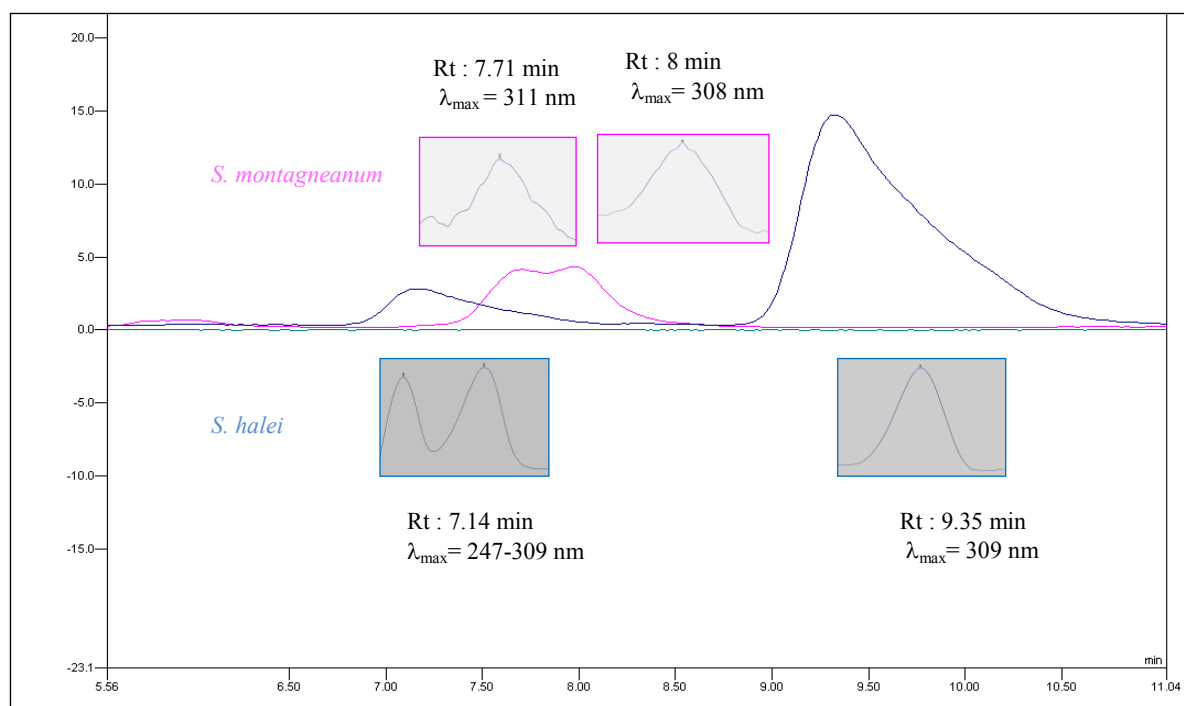
L'appareil disponible au laboratoire est un système associant une colonne Spherisorb ODS2 (25 cm x 4.6 mm, Berkshire, UK) et un détecteur à barrette de diode. Les longueurs d'onde suivies sont 254, 310 et 330 nm. Grâce à la barrette de diode, il est possible de déterminer la longueur d'onde maximale du signal. Seuls les composés ayant un  $\lambda_{\text{max}} > 220$  nm ont été pris en compte (Tableau 12).

**Tableau 12. Composés repérés dans les extraits aqueux par HPLC/UV (en gras, signaux pouvant correspondre à des oxomycosporines)**

lichen	Rt en min. ( $\lambda$ max) des composés présents dans l'extrait
<i>S. grande</i>	5.26(217)
<i>S. vesuvianum</i>	4.12(242) ; 7.14(247,307)
<i>S. halei</i>	3.84(234), 5.26(259), 7.14(247, 309), <b>9.34(309)</b>
<i>S. montagneanum</i>	4.38(251) ; 6.05(246) ; <b>7.71(311), 8(308)</b>
<i>S. graminosum</i>	3.63(235 ,278) ; 4.38(251)
<i>S. vulcani</i>	-
<i>S. evolutum sans apothécies</i>	3.84(234,276) ; 7.37(246)
<i>S. evolutum avec apothécies</i>	3.69(234,276) ; 4.61(260) ; 6.77(245)
<i>S. scutelligerum</i>	-

Plusieurs composés sont retrouvés dans les extraits aqueux et certains sont communs à plusieurs espèces de stéréocaulons. Certains composés possèdent les caractéristiques des mycosporines possédant un noyau cyclohexenone avec un  $\lambda_{\text{max}}$  aux alentours de 310 nm, ils sont retrouvés chez *S. montagneanum* et *S. halei*. (Figure 32).





**Figure 32. Chromatogrammes visibles à 310 nm et spectrogrammes (encadrés couleur) des extraits aqueux de *S. halei* et *S. montagneanum***

#### 4.4.2 Extraits méthanoliques

Les échantillons sont injectés en utilisant la même colonne et le même détecteur mais selon des conditions décrites dans le mode opératoire. Les solutions injectées étaient à 1 mg/mL. Seuls les pics pour lesquels un spectre UV était extractible ont été pris en considération ainsi qu'une aire sous le pic correspondant à au moins 1% du plus grand pic. De plus, seules les valeurs des maxima d'absorption ayant un  $\lambda_{\max} > 220$  nm ont été rapportées.

La méthode de détection par la DAD étant sensible, plus d'une vingtaine de signaux peuvent être mis en évidence pour chaque extrait ; cependant afin de faciliter l'analyse seuls les pics majoritaires ont été pris en compte dans le tableau 13. Un profil similaire entre les chromatogrammes de *S. grande*, *S. evolutum*, (apothécie ou non) et *S. halei* a été observé suggérant un profil phytochimique proche. De même, les spectres de *S. graminosum*, *S. vulcani*, *S. vesuvianum* et *S. dactylophyllum* présentent des similitudes. L'analyse des caractéristiques d'absorption UV permet de réaliser une étude comparative des différents profils obtenus pour les 12 extraits méthanoliques (tab. 13).

Tableau 13. Récapitulatif des signaux récurrents retrouvés dans les extraits méthanoliques des 9 stéréocaulons par HPLC-DAD

R(t)	Abs (nm)	composé supposé	<i>gde</i>	<i>evb</i>	<i>ev</i>	<i>evs</i>	<i>hal</i>	<i>vlc</i>	<i>ves</i>	<i>mtg</i>	<i>gra</i>	<i>dac</i>	<i>sct</i>	<i>cph</i>
33,57-37,05	251-297		x	x	x	x	x							
34,89-41,40	268-315	STC						x	x	x	x	x		
36,74-36-99	244-272-323		x	x										
36,74-39,59	227-257-295		x	x	x									
38,15	240-318							x	x					
39,3-41,98	273-301		x		x		x							
40,93-44,89	270	LOB	x	x	x	x	x							
44,77	241-314	NSTC											x	
43-47,67	268-303	MOC (+ ATRA)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
44,98-45,93	260-273							x	x			x		
45,70-49,55	261-268	ATRA (+ MOC)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x
48,20-53	240-276-333		x	x	x	x								
50,06	240-311												x	
48,99-51,31	241-260-337							x	x	x	x	x	x	
53,60-55,34	252-319							x		x	x		x	

STC : acide stictique, NSTC : acide norstictique, LOB : acide lobarique, MOC : méthyl- $\beta$ -orcinol-carboxylate, ATRA : atranorine  
*gde* : *Stereocaulon grande*, *ves* : *Stereocaulon vesuvianum*, *hal* : *Stereocaulon halei*, *mtg* : *Stereocaulon montagneanum*,  
*gram* : *Stereocaulon graminosum*, *vlc* : *Stereocaulon vulcani*, *evb* : *Stereocaulon evolutum* bis apothécies,  
*evs* : *Stereocaulon evolutum* sans apothecia, **Cph** : Céphalodies de *S. montagneanum*, **stg** : *Stereocaulon scutelligerum*

Comme en CCM les chromatogrammes permettent de visualiser 4 composés majoritaires dont deux sont communs (signaux entre 43 et 48 minutes,  $\lambda_{\text{max}}$  à 268 et 303 nm (méthyl orcinol carboxylate) et un signal très important (atranorine) entre 45 et 50 minutes  $\lambda_{\text{max}}$  à 261 et 269 nm). On notera que seul *S. scutelligerum* ne présente pas ce signal. (Tableau 13)

Pour le premier groupe correspondant à *S. evolutum*, *S. grande* et *S. halei*, on notera les signaux des produits élués entre 33 et 37 minutes,  $\lambda_{\text{max}}$  à 251 et 297 nm et entre 41 et 45 minutes,  $\lambda_{\text{max}}$  à 270 nm (ac. lobarique).

Pour le second groupe (*S. dactylophyllum*, *S. graminosum*, *S. montagneanum*, *S. vesuvianum*, *S. vulcani*) on remarquera les signaux des produits élués entre 35 et 41 minutes,  $\lambda_{\text{max}}$  à 261 et 315 nm (ac. Stictique) et entre 49 et 51 minutes,  $\lambda_{\text{max}}$  à 210, 260 et 337 nm.

Cette technique d'analyse permet de mettre en évidence une très forte corrélation entre les profils phytochimiques de *S. vesuvianum* et *S. vulcani* d'une part, *S. montagneanum* et *S. graminosum* d'autre part. Ces 4 espèces présentent un composé commun élué entre 38-41 minutes avec un  $\lambda_{\text{max}}$  à 268 et 315 nm. 2 autres signaux communs sont mis en évidence pour *S. vesuvianum* et *S. vulcani*. Bien que *S. scutelligerum* présente une corrélation moins forte (ac norstictique), il sera associé à ce groupe.

#### 4.5 Analyses par HPLC-MS

Ces mêmes échantillons ont été analysés par HPLC/ESIMS/MS à Nantes (O Grovel, lab MMS). Ils ont été injectés sur la colonne ayant servi aux essais HPLC/DAD puis nébulisés par une source électrospray soit en mode positif (extraits aqueux) ou en mode négatif (extraits méthanoliques) et les composés sont repérés par un détecteur de type trappe d'ions.

##### 4.5.1 Extraits aqueux

Pour l'échantillon *S. dactylophyllum*, l'extrait a été analysé dans le laboratoire du Pr Bauer à Graz Autriche afin d'obtenir la masse exacte d'une éventuelle mycosporines. Il n'a pas été mis en évidence de signaux absorbant à 310 nm et 330 nm et ayant une ionisation caractéristique des mycosporines.

Dans l'analyse menée sur HPLC/ESIMS/MS à Nantes aucun composé n'a pu être mis en évidence chez les 8 espèces de *Stereocaulon* ; ces résultats sont à relativiser du fait d'une dilution trop importante des échantillons. Une erreur de manipulation nous a conduits à diluer

les quantités résiduelles d'extrait aqueux pour permettre leur injection. Cependant une première élution avec le TFA a permis de repérer quelques composés dans les extraits aqueux dont un composé de masse 303 g.mol<sup>-1</sup>, élué à 7 min qui est retrouvé chez *S. montagneanum* et *S. halei*. De nouveaux essais sont programmés.

#### 4.5.2 Extraits méthanoliques

L'analyse menée sur HPLC/ESIMS/MS permet d'établir une comparaison plus précise des profils phytochimiques des stéréocaulons : le décalage entre les temps de rétention de deux composés supposés identiques est réduit à 1 minute et le logiciel d'exploitation des données permet de sélectionner une masse donnée grâce à l'emploi de filtres. L'étude de la fragmentation des composés apporte des précisions supplémentaires permettant d'avancer des hypothèses plus étayées sur la structure des composés repérés.

**Tableau 14. Récapitulatif des composés retrouvés par LC-MS dans les extraits méthanoliques des 9 espèces de Stéréocaulons**

	R(t) en min	[M-H] -	fragments ppx	composé supposé	gde	ev	evb	evs	hal	ves	dac	mtg	vlc	sct	gra
1	61,13-61,43	401	357-313	acide peristictique								x			
2	64,01	538,8	425-403-393											x	
3	65,06-65,5	372,9	329-355-311	acide menegazziaïque							x	x	x		
4	65,18-65,2	251	207		x	x	x	x	x						
5	65,18-65,2	525	251-207	dimère de 251 + Na	x	x		x							
6	66,2-67,4	431,1	387-343								x	x	x		x
7	66,89	387,1	343-299	acide cryptostictique								x	x		
8	67,71-68,91	417	385								x	x	x	x	
9	67,97	856,8	824,7-793											x	
10	67,4-68,78	385	341-297	acide stictique							x	x	x	x	x
11	68,28	834,6	802-815											x	
12	68,18-68,69	473,2	455-411-429	lobariol ?	x	x	x	x	x						
13	69-69,29	441,2	397-355	acide colensoïque	x	x									
14	68,56-69,54	371	327-227,6-243,6	acide norstictique							x	x	x	x	
15	69,17-69,24	623,1	501-528,7-487				x	x							
16	69,39-70,7	487,2	411,7-443,2-265,6		x	x	x	x							
17	70,81-72,07	933	455	dimère + Na	x	x	x	x	x						
18	70,01-72,74	455	411,4-369,6	acide lobarique	x	x	x	x	x	x					
19	70,81-72,49	910	455	dimère	x	x	x	x	x						
20	70,07-72,3	519	477-455				x	x		x					
21	71,96	469,1	451-437											x	
22	73,3-74,4	387,2	355-343-325-369	acide salazinique ?							x	x	x		
23	73,46-73,58	357,2	339-313-295-327	acide hyposalazinique							x		x		
24	73,21	417,1	357-385-313-389									x	x	x	
45	74,82	401	357-313	acide constictique								x			
26	75,13-75,41	417,4	417,4-399									x	x	x	
27	74,2	807,2	(774) ?										x		
28	74,93-75,61	835,1	802-791,5		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
29	75,03	857,4	417-439											x	
30	75,28	627,1	595-610												x
31	75,7	429,2	385-251		x	x	x								
32	76,63	385,1	341-353-313									x		x	
33	77,51	554,9	511-251		x										
34	79,57	717	672,2												x
35	79,76	770,9	726,5-738,1												x

gde : *Stereocaulon grande*, ves : *Stereocaulon vesuvianum*, hal : *Stereocaulon halei*, mtg : *Stereocaulon montagneanum*, gram : *Stereocaulon graminosum*, vlc : *Stereocaulon vulcani*, evb: *Stereocaulon evolutum* bis apothécies, evs: *Stereocaulon evolutum* sans apothecia, Cph: Céphalodies de *S. montagneanum*, stg: *Stereocaulon scutelligerum*

Un large pic de forte intensité visible aux alentours de 71-72 minutes et présentant un pic de base [M-H]<sup>-</sup> 455 g. mol<sup>-1</sup> est retrouvé chez *S. grande*, *S. evolutum*, ainsi que chez *S. halei*, mais en proportion plus faible. Cette observation confirme l'hypothèse de la prédominance de l'acide lobarique chez ces espèces qui apparaît clairement sous forme de monomère et de dimère. Un composé de masse 251 g.mol<sup>-1</sup> retrouvé également sous forme de dimère est présent chez ces espèces.

*S. vulcani*, *S. montagneanum*, *S. graminosum* et *S. dactylophyllum* présentent de façon générale un premier pic dont le composé majoritaire possède une masse de 431 g.mol<sup>-1</sup> suivi d'un deuxième pic dont le composé principal présente une masse de 385 g.mol<sup>-1</sup>. Ces deux pics apparaissent successivement après 68 minutes. Ce deuxième composé correspond au poids moléculaire de l'acide stictique. Pour ces espèces (excepté *S. graminosum*), ces deux pics sont suivis d'un pic de faible intensité présentant un composé dont la masse est 371 g.mol<sup>-1</sup>, ce composé est très minoritaire dans la plupart des espèces mais il est retrouvé majoritairement chez *S. scutelligerum*, ce composé est probablement l'acide norstictique.

Le tableau 14 est un récapitulatif de tous les composés retrouvés dans les différents extraits, le composé 28 est détectable chez toutes les espèces excepté *S. halei*. Les deux profils phytochimiques énoncés précédemment sont bien mis en évidence, les espèces ayant le profil 1 (*S. evolutum*, *S. evolutum sans apothécies*, *S. evolutum bis apothécies*, *S. grande*, *S. halei*) présentent 4 composés récurrents (4, 17, 18, 19), les espèces possédant le profil 2 (*S. montagneanum*, *S. vesuvianum*, *S. vulcani*, *S. dactylophyllum*, *S. graminosum*) possèdent 3 composés récurrents (6, 10 et 28)

Les trois échantillons de *S. evolutum* ramassés (2 à Commana (Finistère) avec et sans apothécies et l'échantillon récolté à St Just (Ille et Vilaine)) présentent la même composition chimique avec 8 composés communs (4, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 28). *S. evolutum* est particulièrement proche phytochimiquement de *S. grande* puisque l'on compte 10 composés communs pour ces deux espèces (4, 5, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 28, 31). De même, *S. montagneanum*, *S. dactylophyllum* et *S. vulcani* présentent 6 composés communs (6, 8, 10, 14, 22, 28), la corrélation est encore plus forte entre *S. montagneanum* et *S. vulcani* puisque 9 composés identiques sont retrouvés chez ces deux espèces (6, 7, 8, 10, 14, 22, 24, 26, 28).

#### 4.6 Discussion - conclusion

Nos travaux ont permis d'étudier les profils phytochimiques des lichens du genre *Stereocaulon* grâce à plusieurs techniques d'analyses. L'HPTLC a permis d'effectuer une première approche des composés présents et d'orienter nos recherches. Grâce à cette méthode, près d'une dizaine de composés, avec leurs spectres UV associés, ont été mis en évidence pour chaque espèce. La révélation des plaques par l'ANS, la comparaison aux témoins et l'expérience du laboratoire, ont permis d'avancer des hypothèses sur l'identité des composés. L'HPLC permet une séparation plus performante des composés puisque près d'une vingtaine de pics sont observables grâce à la détection de la barrette de diodes. Le comparatif est cependant moins rapide avec parfois des décalages au niveau de temps de rétention. En utilisant l'HPLC/MS plus de 35 composés différents sont mis en évidence : les détecteurs UV révèlent uniquement les composés aromatiques alors que la spectroscopie de masse détecte tous les composés ionisables présents dans l'extrait (aromatiques et aliphatiques). Le spectrophotodensitomètre nous renseigne seulement sur l'intensité de l'absorbance à une longueur d'onde donnée, alors que la DAD apporte des informations sur la totalité du spectre d'absorption UV permettant ainsi une caractérisation plus fine des composés. L'analyse par LC-MS est celle qui nous a permis de réaliser les profils les plus précis, la spécificité de cette méthode est d'apporter des informations sur la structure des molécules grâce à l'étude de la fragmentation des composés. Cependant, un écueil de cette méthode est de ne pas mettre en évidence les deux composés (MOC et atranorine) qui semblent pourtant être omniprésents et majoritaires comme le montrent les méthodes précédentes. Une autre limite apparaît aussi en ce qui concerne le repérage des composés présents dans les extraits aqueux : il est difficile de rechercher les mycosporines en LC-MS sans les informations simultanées d'un détecteur UV (absorbances comprises entre 310 et 360 nm). Ainsi la mise en évidence des mycosporines par HPTLC permet d'en repérer cinq alors que trois seulement sont mises en évidence par HPLC. Les profils phytochimiques obtenus par extraction aqueuse sont peu informatifs d'un point de vue chimiotaxonomique alors que les profils obtenus par extraction méthanolique sont plus exploitables dans ce sens. Les appariements qui résultent de ces analyses phytochimiques permettent de distinguer 2 profils :

1- *S. evolutum*, *S. grande* et *S. halei*

2- *S. vulcani*, *S. dactylophyllum*, *S. graminosum* et *S. vesuvianum* ; bien que présentant un profil phytochimique unique, *S. scutelligerum* peut être rapproché de ce groupe.

L'identification des composés présents dans nos différents extraits, nous a permis d'observer la présence systématique de MOC et d'atranorine. Ils pourraient être des marqueurs du genre s'ils n'étaient aussi très communs dans un grand nombre de lichens. On peut également distinguer les stéréocaulons à dominante acide lobarique et les stéréocaulons à dominante acide stictique. La coexistence de ces deux depsidones est extrêmement rare au sein d'une même espèce, *Stereocaulon azoreum* semblerait être le seul du genre à présenter simultanément l'acide lobarique et l'acide stictique (annexe). Nos travaux ont permis la mise en évidence de l'acide stictique chez *S. graminosum*, *S. dactylophyllum*, *S. vulcani*, *S. montagneanum* et *S. scutelligerum*. La présence de cet acide chez les stéréocaulons est largement décrite dans la littérature notamment chez les espèces, *S. foliosum*, *S. cornutum*, *S. azoreum*, *S. spathuliferum*, *S. strictum*, *S. tomentosum*, *S. piluliferum* et *S. meyeri* (annexe 3). Le deuxième composé retrouvé chez ces stéréocaulons est l'acide norstictique, bien qu'il soit très majoritaire dans *S. scutelligerum*, on le retrouve en plus faible abondance chez *S. dactylophyllum*, *S. vulcani* et *S. montagneanum*, la littérature rapporte également la présence de l'acide norstictique chez *S. spathuliferum* et *S. meyeri* (annexe 3). Nous avons également mis en évidence la présence d'acide lobarique en grande quantité dans les espèces *S. evolutum*, *S. grande*, *S. halei*.

Le deuxième groupe de molécules mis en évidence dans nos travaux correspond aux mycosporines. Des signaux correspondant aux profils de ces composés sont présents chez *S. montagneanum* (HPTLC et HPLC) et *S. halei* (HPLC). La présence de céphalodies chez ces deux espèces pourrait être liée à cette singularité dans la mesure où ces organes contiennent des cyanobactéries connues pour fixer l'azote atmosphérique et synthétiser ce type de composés. Les analyses réalisées sur ces organes prélevés chez chacun de ces lichens montrent en effet un signal quantitativement plus important.

Suite à cette étude qui précise les profils phytochimiques de plusieurs espèces de Stéréocaulons, nous avons orienté nos travaux de phytochimie vers les espèces *S. halei* et *S. montagneanum* qui avaient aussi pu être récoltées en grande quantité en Indonésie



---

## 5 Discussion – approche de l’analyse croisée des résultats

Dans sa publication de 1938, Johnson a décrit l’évolution des lichens au travers de leur morphologie et sa proposition pour classer les espèces de stéréocaulons est reprise Figure 33. Cette figure intègre également une partie de nos conclusions.

- Absentes chez les espèces ancestrales, les premières céphalodies sont sphériques puis deviennent progressivement botryoïdes et de type scrobiculées.
- Au cours de l’évolution, la taille des spores ainsi que leur nombre de septa a tendance à augmenter.
- Le nombre des apothécies et leur taille serait également un critère d’évolution : plus elles seraient nombreuses et grandes, plus l’espèce de *Stereocaulon* serait évoluée.
- Une augmentation de la hauteur de l’hyménium et de l’hypothécium serait également visible chez les espèces les plus évoluées.
- La forme des phylloclades pourrait également être un critère d’évolution. Les phylloclades granuliformes et papilliformes représenteraient un type ancestral par rapport aux formes dérivées coralloïdes et phyllocladioïdes.

Lorsqu’elles sont présentes, Johnson (1938) a constaté que le type de cyanobactérie présent dans les céphalodies n’est pas un critère d’évolution fiable dans la mesure où l’association n’est pas monospécifique (une même espèce de Stéréocaulon peut héberger différents genres ou espèces de cyanobactéries).

Nous pouvons alors classer nos neuf espèces en fonction de leur morphologie. Ainsi, nous possédons deux espèces probablement ancestrales puisque les céphalodies sont manquantes, en l’occurrence *S. vulcani* et *S. scutelligerum*, cinq espèces (*S. dactylophyllum*, *S. evolutum*, *S. grande*, *S. graminosum*, *S. vesuvianum*) avec des céphalodies sphériques, des spores de petite taille et peu septées et deux espèces plus récentes *S. halei* et *S. montagneanum* avec des céphalodies scrobiculées, présentant soit des spores de grande taille et de nombreux septa (*S. montagneanum*), soit des spores de taille plus modeste avec peu de septa (*S. halei*), des phylloclades de type coralloïde et des branches phyllocladioïdes.

Si on classe maintenant nos espèces de Stéréocaulons au sein des clés de détermination de Duvigneaud 1956 et de Lamb 1977 (cf annexe 4), on s’aperçoit que les espèces les moins évoluées appartiennent aux sous-genres *Stereocaulon* / *Enteropodium* (c’est-à-dire regroupant des espèces avec des phylloclades dorsiventrals, des céphalodies

sphériques, des spores de 20-40 µm avec 7 septa maximum) et que les plus évoluées appartiennent aux sous-genres Holostelidium / Lecanocaulon et Rhopalophoron (c'est-à-dire regroupant des espèces avec des phylloclades radiaires, des spores longues de 75 – 180 µm)

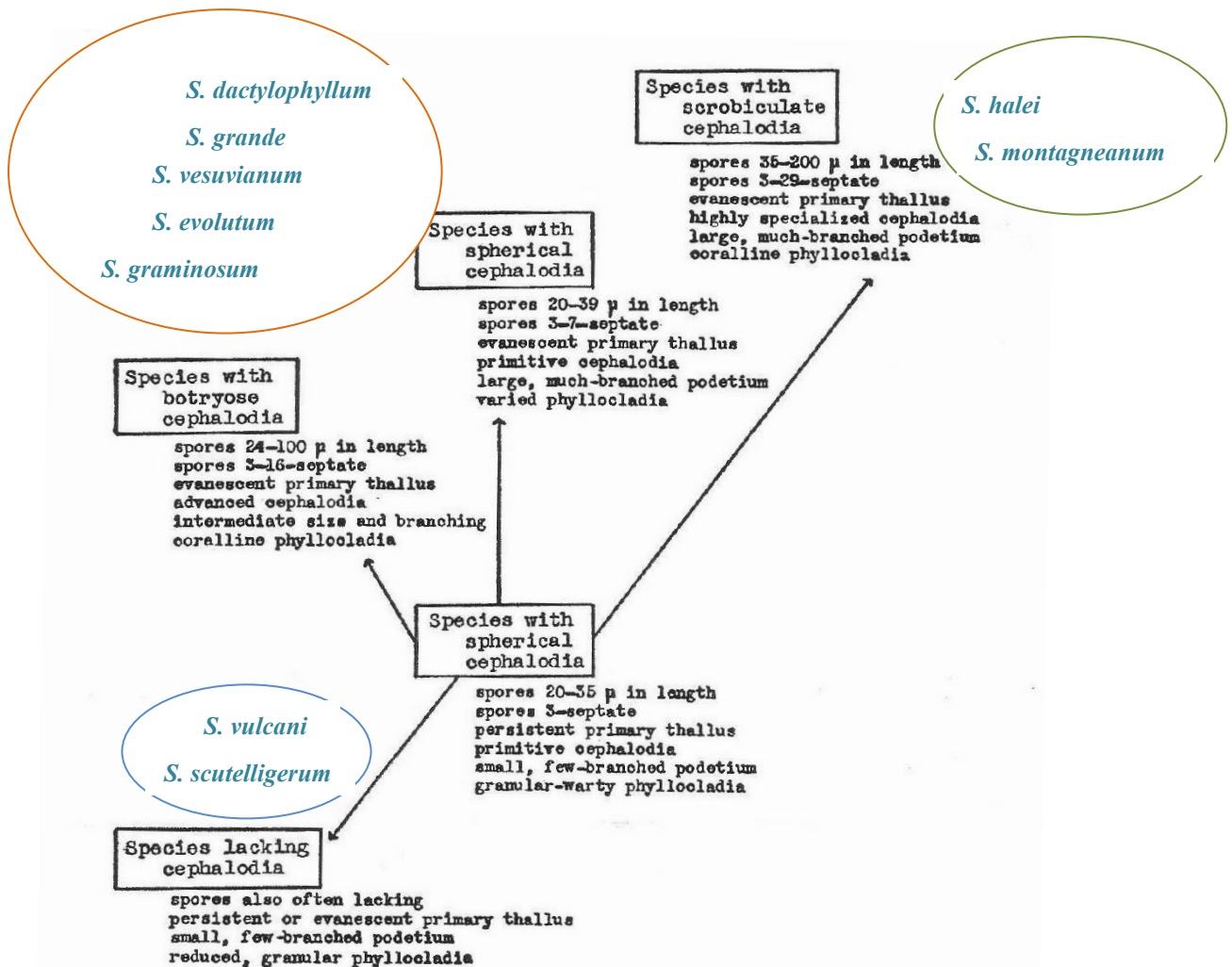


Fig. 2. A diagrammatical presentation of the phylogenetic connections within the genus *Stereocaulon* suggested in the text.

Figure 33. Classification des 9 Stéréocaulons selon leur morphologie d'après les critères de Johnson (Johnson 1938).

Hognabba (2006) a comparé son arbre phylogénétique fondé sur l'analyse de 98 séquences issues de 49 espèces de Stéréocaulon à la classification de Lamb, 1977. Nous avons tenté de faire de même avec notre arbre d'inférence bayésienne incrémenté des données des 52 séquences ITS de stéréocaulons déposées dans la GenBank. Nous avons utilisé la même symbolique que celle utilisée par Hognabba pour distinguer les sous-genres, sections et sous-

sections pour chaque espèce, à la fois sur l'arbre phylogénétique (Figure 26) et dans le tableau 15.

Le clade IIb comprenant nos seuls échantillons de *S. montagneanum* renferme les espèces appartenant au sous-genre *Holostelidium*, section *Holostelidium*, sous-section *Holostelidium*. Il aurait été intéressant de voir si *S. sorediiferum* appartenant à cette même sous-section aurait été proche phylogénétiquement de *S. montagneanum* mais malheureusement la séquence ITS était absente de la genBank. Ce clade comprend des espèces avec des branches phyllocladioïdes et des spores vermiformes (6-)8-30 septées. Dans la classification de Lamb, au sein de ce même sous-genre et de cette même section, il existe une sous-section appelée *Aciculisporae* caractérisée également par des espèces avec des branches phyllocladioïdes mais des spores fusiformes et 3-7 septées. Nous pouvons observer que cette sous-section appartient au clade IIa. Néanmoins, cette sous-section regroupe des espèces montrant de fortes divergences entre elles. Nos échantillons de *S. halei* nouvellement intégrés à cet arbre confirment cette observation. Cependant, l'analyse moléculaire permet de différencier le sous-genre *Holostelidium* (clade I<sub>A</sub>) qui forme ainsi un groupe monophylétique et les deux sous-sections des *Holostelidium* et *Aciculisporae*.

Au sein du clade I<sub>F</sub>, on retrouve des espèces appartenant au sous-genre *Stereocaulon* section *Stereocaulon*, des espèces appartenant au sous-genre *Stereocaulon* section *Denudata* sous-section *Botryoideum* et des espèces appartenant au sous-genre *Lobophoron*. Notre espèce *S. dactylophyllum* devrait appartenir à ce clade mais il semble plus proche d'une espèce *S. scutelligerum* appartenant au sous-genre *Stereocaulon* section *Denudata* sous-section *Denudata*. Hognabba (2006) avait également analysé cette espèce qui apparaît dans le sous-groupe I<sub>F</sub> (ses séquences ITS ne sont pas disponibles). La différenciation moléculaire de ces trois sous-sections ne semble pas réalisable à partir de ces seuls résultats, d'autres régions du génome doivent être ciblées pour affiner les relations phylogénétiques à cette échelle taxonomique. En revanche, *S. coniophyllum* et *S. foliolosum* appartenant au sous-genre *Stereocaulon* section *Lobophoron* ne se distinguent pas de la section *Stereocaulon* et ces résultats sont en désaccord avec ceux d'Hognabba (2006).

Les clades I<sub>B</sub>, I<sub>D</sub>, I<sub>E</sub> ainsi que notre espèce récoltée *S. vesuvianum* et l'échantillon *S. virgatum* appartiennent au sous-genre *Stereocaulon* section *Denudata* sous-section *Denudata*. Ces espèces sont des espèces faciles à reconnaître morphologiquement par l'organisation dorsiventrale de leurs phylloclades verruqueuses à peltées et coralloïdes. Nous avons enrichi

le nombre d'espèces par l'apport des séquences de *S. scutelligerum*, *S. vulcani*, *S. vesuvianum*. Cependant, ces espèces ne forment pas un groupe monophylétique. Ainsi, les spécimens de *S. vesuvianum* étudiés se répartissent dans deux lignées-différentes et cette hétérogénéité pourrait être expliquée par sa plasticité morphologique (Lamb avait distingué 6 formes et 6 variétés) et sa vaste répartition géographique (Tableau 15). Une étude phylogéographique portant exclusivement sur des populations de *S. vesuvianum* s'avère nécessaire pour (i) délimiter le statut de cette espèce, (Hasegawa, Iida et al.) (Hasegawa, Iida et al.) décrire le profil de variation génétique observé à l'échelle de l'aire de distribution de l'espèce, (iii) élucider les mécanismes évolutifs (facteurs historiques, migration...) à l'origine des divergences estimées.

Le clade Ic comprend trois espèces qui sont des espèces crustacées : *S. leucophaeopsis*, *S. tornense* et *S. urceolatum*. Ces espèces sont regroupées au sein d'un même sous-clade. *S. virgatum* se trouve dans le même clade alors qu'il appartient au sous-genre *Stereocaulon* section *Denudata* sous-section *Denudata*.

En conclusion, la morphologie sur laquelle est basée la classification de Lamb (1977) n'est pas entièrement supportée par nos données moléculaires. La topologie de l'arbre phylogénétique obtenu permet seulement de distinguer les deux grands sous-genres *Holostelidium* et *Stereocaulons*, ainsi que les deux grandes sous-sections des *Holostelidium* et des *Aciculisporae*. Même si Schoch et al (Schoch, Seifert et al. 2012.) soulignent la pertinence de la région ITS par rapport à d'autres régions du génome testées pour rendre compte des relations de proximité au niveau intra et interspécifique de champignons ascomycètes, l'utilisation de marqueurs génétiques moins variables au niveau interspécifique en termes de longueurs de fragments (délétions importantes dans la région ITS utilisée) s'avère nécessaire pour une appréciation plus fine de leurs divergences morphologiques. Le gène codant pour l'une des grosses sous-unités de l'ARN polymérase (gène RBP1) semble particulièrement indiqué pour délimiter les Pezizomycotina (Hofstetter, Miadlikowska et al. 2007 ; Schoch, Seifert et al. 2012.).

La corrélation entre la phylogénie moléculaire et le profil en métabolites secondaires majoritaires est difficile à établir même parmi les stéréocaulons étudiés par Hognabba (2006, Tableau 15). Le biais réside dans la distribution restreinte ou cosmopolite du lichen qui, lorsqu'il est répandu, est variable morphologiquement et chimiquement. Une analyse s'adossant sur un panel plus large de métabolites comme les métabolites minoritaires est

envisagée afin de mettre en évidence des marqueurs d'une espèce ou d'un clade phylogénétique. De même, il semble difficile de corrélérer l'habitat à la phytochimie des espèces : *S. halei* et *S. graminosum* ont été récoltés au même endroit et ne possèdent pas les mêmes métabolites majoritaires. La convergence des données morphologiques et des métabolites majoritaires semble également difficile à observer : *S. halei*, *S. montagneanum* présentent des caractéristiques morphologiques proches mais des profils phytochimiques différents. Ces exemples pris de façon ponctuelle ne semblent pas aller dans le sens d'une convergence morphologique, génétique et métabolique. Une analyse multivariée combinant variable morphologique (botaniques), génétiques (moléculaires) et métaboliques (méthodes HPTLC, HPLC, MS) semble indispensable pour confirmer de telles observations et déceler d'éventuelles associations.

**Tableau 15. Récapitulatif des données relatives aux Stéréocaulons étudiés par Hognabba et dans notre étude (en rouge) relativement à leur classification selon Lamb, leurs métabolites majoritaires, et leur localisation géographique.**

<b>Espèce de Stéréocaulon</b>	<b>Classification de Lamb, 1977</b>	<b>Métabolites majoritaires autre qu'atranorine</b>	<b>Endroit du prélèvement</b>	<b>Répartition géographique des espèces</b>
<i>S. virgatum</i>	▲	S, N	64 : La Dominique	Antilles, Amérique centrale (Nicaragua)
<i>S. verruciferum</i>	▲	S, N	99 : Argentine	Argentine, Chili, Equateur, Colombie
<b><i>S. vulcani</i></b>	▲	S 2 chimiotypes	La Réunion	ch.I : Réunion, Afrique (Zaïre, Rwanda, Burundi), Canaries, Azores, Hawaï ch.II : Canaries, Azores, Hawaï
<b><i>S. vesuvianum</i></b> <i>S. vesuvianum</i>	▲	S S, N	Italie 25 : Finlande	dans les 2 hémisphères en régions volcaniques
<b><i>S. scutelligerum</i></b>	▲	N	La Réunion	Réunion, Maurice, Madagascar
<i>S. verruculigerum</i>	Δ	L	30 : Indonésie – Java 68 : Philippines	Java, Sumatra, Célèbes, Formose, Japon
<i>S. japonicum</i>	Δ	S, N	55 : Japon 45 : Corée	Japon, Formose, Chine, Hong Kong, Philippines
<i>S. exutum</i>	Δ	L	70 : Japon	Japon, Corée, ex-USSR (Extrême orient), Australia
<i>S. pendulum</i>	Δ	P	69 : Japon	Japon
<i>S. curtatum</i>	Δ	M	49 : Japon	Japon
<b><i>S. dactylophyllum</i></b>	■	S	Bretagne, France	espèce amphiatlantique (Europe, est de la Russie jusqu'à l'Oural, Groenland, est du Canada et des USA, sud de la Scandinavie)
<b><i>S. grande</i></b>	■	L	Haute Savoie, France	boréale- circumpolaire (Suède, Norvège, Finlande, Russie, Groenland, Canada, USA)
<i>S. alpestre</i>	■	?	Islande	
<i>S. alpinum</i>	■	L	98 : Italie 00 : Argentine 03 : Argentine 60 : Autriche	Suède, Norvège, Finlande, France, Allemagne, Suisse, Autriche, Italie du nord, Hongrie, Pologne, Bulgarie, ex-URSS, Mongolie, Islande, Groenland, Canada, Corée, Inde, Pakistan, Pérou, Chili, Argentine, Géorgie du sud
<i>S. sasakii</i>	■	L	57 : Japon	Asie de l'est (Formose, Japon, Chine, Java, Himalaya), USA du nord-ouest
<i>S. azureum</i>	■	L,S,N	66 : Madère	Açores, Madère, Canaries
<i>S. botryosum</i>	■	P	75 : Svalbard, Norvège	circumpolaire boréale-arctique, Alpes de l'Europe centrale, Suède, Norvège, Finlande, France, Suisse, Autriche, Italie du nord, ex.USSR, Islande, Groenland, Canada
<i>S. rivulorum</i>	■	4 chimiotypes ch.I : Pe, A	28 :Norvège	circumpolaire nord, arctique-alpine, Alpes de l'europe centrale, montagnes Altai de Russie et Mongolie

		ch.II : L ch.III : S, N ch.IV : -		ch.I : Scandinavie, Islande, Groenland, Alaska ch.II et IV : montagnes boréales, Arctique ch.III : Groenland, Jan Mayen
<i>S. tomentosum</i>	■	S, N	94 : Finlande 08 : Argentine	Montagnes boréales tempérées, circumpolaire (sauf régions arctiques) jusqu'à l'hémisphère sud
<i>S. farinaceum</i>	■	P, A	73 : Finlande	Suède, Norvège, Finlande, Autriche, Suisse, Islande, Groenland
<i>S. glareosum</i>	■	2 chimiotypes : ch.I : S, N ch.II : N	74 : Finlande	Chili, Argentine, Géorgie du sud, Antarctique de l'ouest,
<i>S. pileatum</i>	■	L	27 : non précisé dans article	Très répandu dans tout l'hémisphère nord
<i>S. depreaultii</i>	■	L	47 : Japon	Canada, Japon
<i>S. glabrum</i>	■	2 chimiotypes : ch.I : S, N ch.II : N	01: Argentine 02: Argentine 12 : Argentine	Chili, Argentine, Géorgie du sud, Antarctique de l'ouest
<i>S. intermedium</i>	■	L	34 : Chine	amphi-pacifique du nord, Amérique du nord, ex-USSR, Japon, Canada, USA
<i>S. myriocarpum</i>	■	S, N	31 : Chine 32 : Chine 34 : Chine	Amérique du nord, centrale, sud et Asie
<i>S. paschale</i>	■	L	24 : Finlande 97 : Finlande	Suède, Norvège, Danemark, Finlande, Ecosse, Allemagne, Pologne, ex-USSR, Mongolie, Islande, Groenland, Canada, USA, Corée, Japon, Chili, Argentine
<i>S. saxatile</i>	■	L	18 : Finlande 20 : Finlande	sub-océanique du nord (jamais dans régions arctiques, hémisphère sud, Asie) : Suède, Norvège, Danemark, Finlande, Belgique, Angleterre, Ecosse, Allemagne, Pologne, ex-USSR, Québec, USA
<i>S. subcoralloides</i>	■	L	96 : Finlande	circumpolaire boréale (Suède, Norvège, Finlande, ex-USSR, Canada, USA)
<i>S. taeniarum</i>	■		19 : Finlande	
<b><i>S. evolutum</i></b> <i>S. evolutum</i>	■	L	Bretagne, France 22 : Finlande	Europe subocéanique (Europe de l'Ouest de la Scandinavie et les Iles Feroe, nord de l'Espagne, Portugal, Madère, Canaries, Finlande, Belgique, Angleterre, Allemagne..)
<b><i>S. halei</i></b>	○	L 3 chimiotypes	Sumatra, Indonésie	Sud-Est de l'Asie (Java, Lombok, Sumatra, Célèbes, Nouvelle Guinée, Malaisie, Bornéo, Philippines, Formose)
<i>S. corticatum</i>	○	R	04 : Argentine	Nouvelle Zélande, Australie, Tasmanie, Argentine, Chili, Afrique du sud
<i>S. atlanticum</i>	○	S, N	65 : Madère	Açores, Afrique centrale, Afrique du sud, Costa Rica, Vénézuëla, Equateur, Pérou, Bolivie
<i>S. ramulosum</i>	○	Pe, A	47 : Hawaï	largement répandu dans l'hémisphère sud et pénètre dans l'hémisphère nord jusqu'en Amérique

			07 : Argentine	centrale et les Antilles
<i>S. fronduliferum</i>	○	F	62 : Nouvelle Zélande	Nouvelle Zélande
<i>S. implexum</i>	○	3 chimiotypes : ch.I : L ch.II : M ch.III : N, Sa	72 : Ile Gough	ch.I : Chili et Argentine ch.II : Tristan da Cunha ch.III : Tristan da Cunha et ile de Gough
<i>S. montaganum</i>	●	S	Sumatra, Indonésie	Indonésie (Java, Sumatra, Célèbes), Malaisie, Bornéo, Nouvelle-Guinée
<i>S. coniophyllum</i>	□	L	56 : Chine	Europe, Amérique du nord, Himalaya, Afrique, Japon, Suède, Norvège, Finland, Autriche, Canada, USA, Inde du nord, Népal, Sikkim
<i>S. nanodes</i>	—	L	70 : Norvège	Europe centrale et du nord, Amérique du nor-est, Suède, Norvège, Finlande, Belgique, Angleterre, Allemagne, Suisse, Autriche, Italie, ex-USSR
<i>S. cumulatum</i>	?		05 : Argentine	non décrit

Pour les métabolites : S : acide stictique ; N : acide norstictique ; L : acide lobarique ; R : acide rangiformique ; P : acide porphyrique ; Pe : acide perlatolique ; A : acide anziaique ; M : acide myriquidique, F : acide fumarprotocétrarique, Sa : acide salazinique

Le N° attribué près de chaque localité où a été ramassé le lichen correspond aux deux derniers chiffres du numéro de la séquence ITS obtenus par Hognabba.

<b>Légende</b>			
<b>Subgenus</b>		<b>Section</b>	<b>Subsection</b>
■	<i>Stereocaulon</i>	<i>Stereocaulon</i>	
□	<i>Stereocaulon</i>	<i>Lobophoron</i>	
▲	<i>Stereocaulon</i>	<i>Denudata</i>	<i>Denudata</i>
△	<i>Stereocaulon</i>	<i>Denudata</i>	<i>Botryoideum</i>
—	<i>Stereocaulon</i>	<i>Stereocladium</i>	
●	<i>Holostelidium</i>	<i>Holostelidium</i>	<i>Holostelidium</i>
○	<i>Holostelidium</i>	<i>Holostelidium</i>	<i>Aciculisporae</i>
*	crustose Sterocaulon		





**PARTIE 2**  
**Etudes phytochimiques**



Les résultats du criblage précédent ont permis de mettre en évidence que deux espèces proches récoltés en Indonésie, *S. halei* et *S. montagneanum* possédaient des métabolites intéressants aussi bien dans leurs fractions méthanoliques que dans leurs fractions aqueuses. De plus, ces deux espèces sont présentes en grande quantité et leur récolte ne menace pas la biodiversité. Ainsi, elles ont été sélectionnées afin de conduire une étude phytochimique approfondie. Dans un premier temps, un recueil sélectif des échantillons a été effectué en se basant sur les études botaniques précédemment conduites et les espèces ont ensuite été nettoyées en enlevant principalement les mousses, la terre et les morceaux de roche.

---

## 1 Etude phytochimique de *Stereocaulon halei* Lamb

### 1.1 Extraction

Le lichen séché à l'air (1 kg) a été broyé puis a été placé au contact des solvants. L'extraction a été réalisée à froid par macération et les quatre solvants de polarité croissante utilisés ont été le *n*-hexane, l'acétate d'éthyle, l'acétone et le méthanol (fig. 34). Quatre extraits ont été obtenus successivement : l'extrait *n*-hexane, acétate d'éthyle (AcOEt), acétone et méthanol.

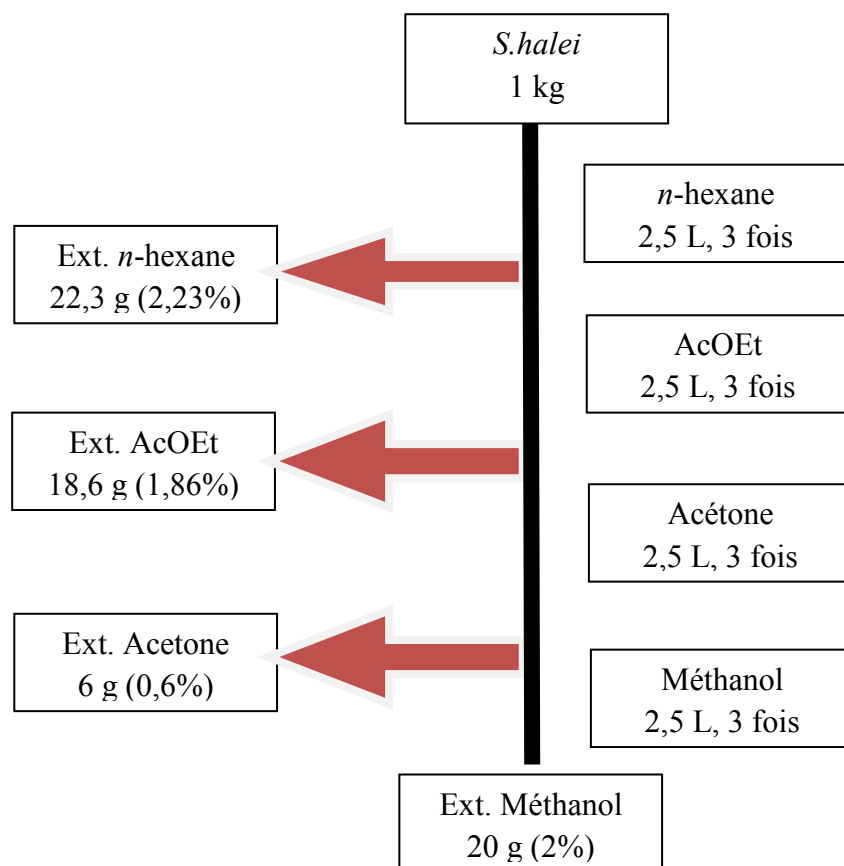


Figure 34. Schéma d'extraction de *S. halei*. Obtention et masse des extraits obtenus (%= taux d'extraction)

Le processus de macération est effectué sur l'intervalle de deux jours pour chacun des solvants et répété 2 fois. Chaque extrait a été concentré *in vacuo* et 2 précipités (précipités A et B) se sont formés lors de l'évaporation des solvants à température ambiante au sein des extraits *n*-hexane et acétate d'éthyle.

Il ressort de cette extraction que de grandes quantités de précipité sont facilement obtenues à partir des fractions *n*-hexane (20,3 g) et AcOEt (5,4 g) qui représente près des 2/3 des composés extractibles, le taux d'extraction global étant de l'ordre de 7%. La répartition globale des composés selon leur polarité est à peu près équivalente (2,3% apolaires, 2,4% moyennement polaires et 2% polaires).

## 1.2 Purification

L'appréciation qualitative de la composition de chacun des extraits lichéniques est effectuée par comparaison des profils en CCM. Les extraits ayant un profil comparable sont réunis avant d'être purifiés (fig. 35-36). Les fractionnements sont menés sur les résidus obtenus après évaporation du surnageant des fractions *n*-hexane, AcOEt et Acétone. Les

techniques employées sont essentiellement la Chromatographie sur Colonne ouverte (CC), la Chromatographie Flash (FC) et la Chromatographie Circulaire Centrifuge (CCC)

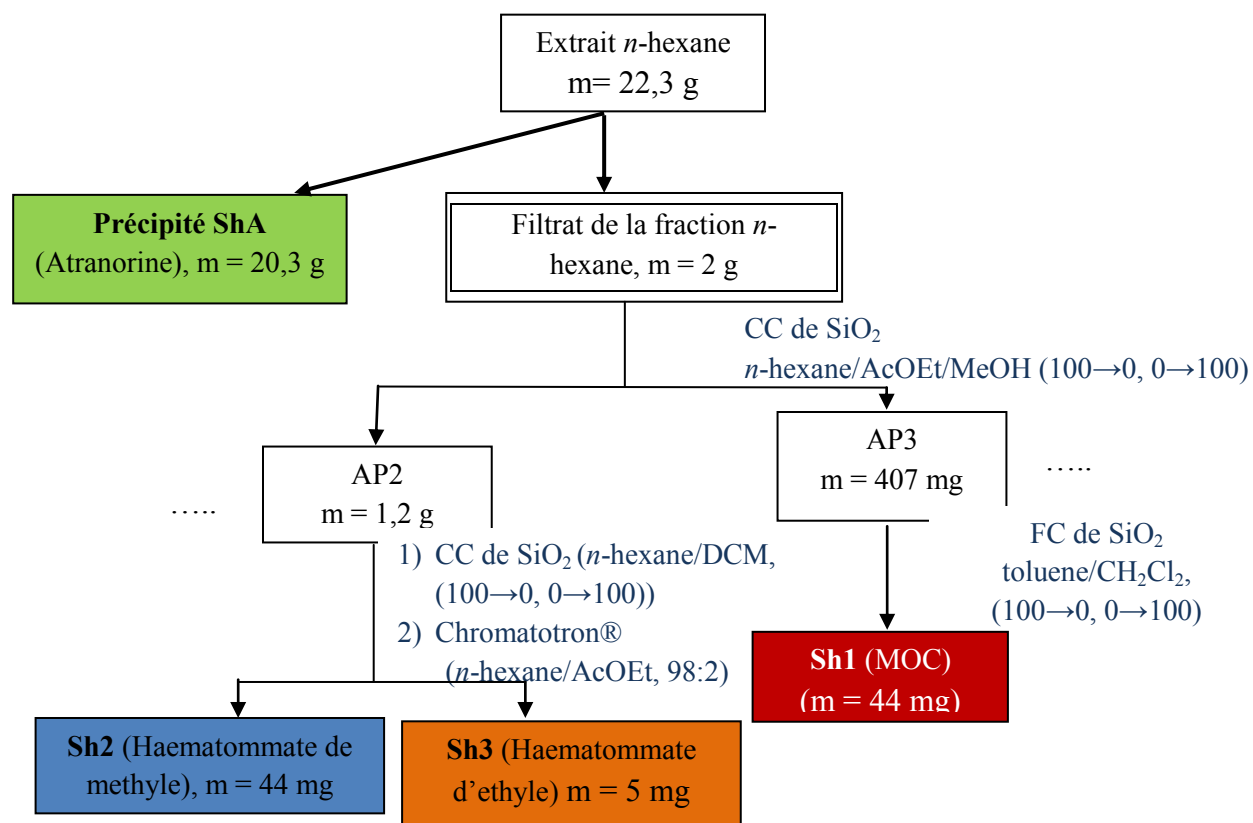


Figure 35. Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait hexanique de *S. halei*

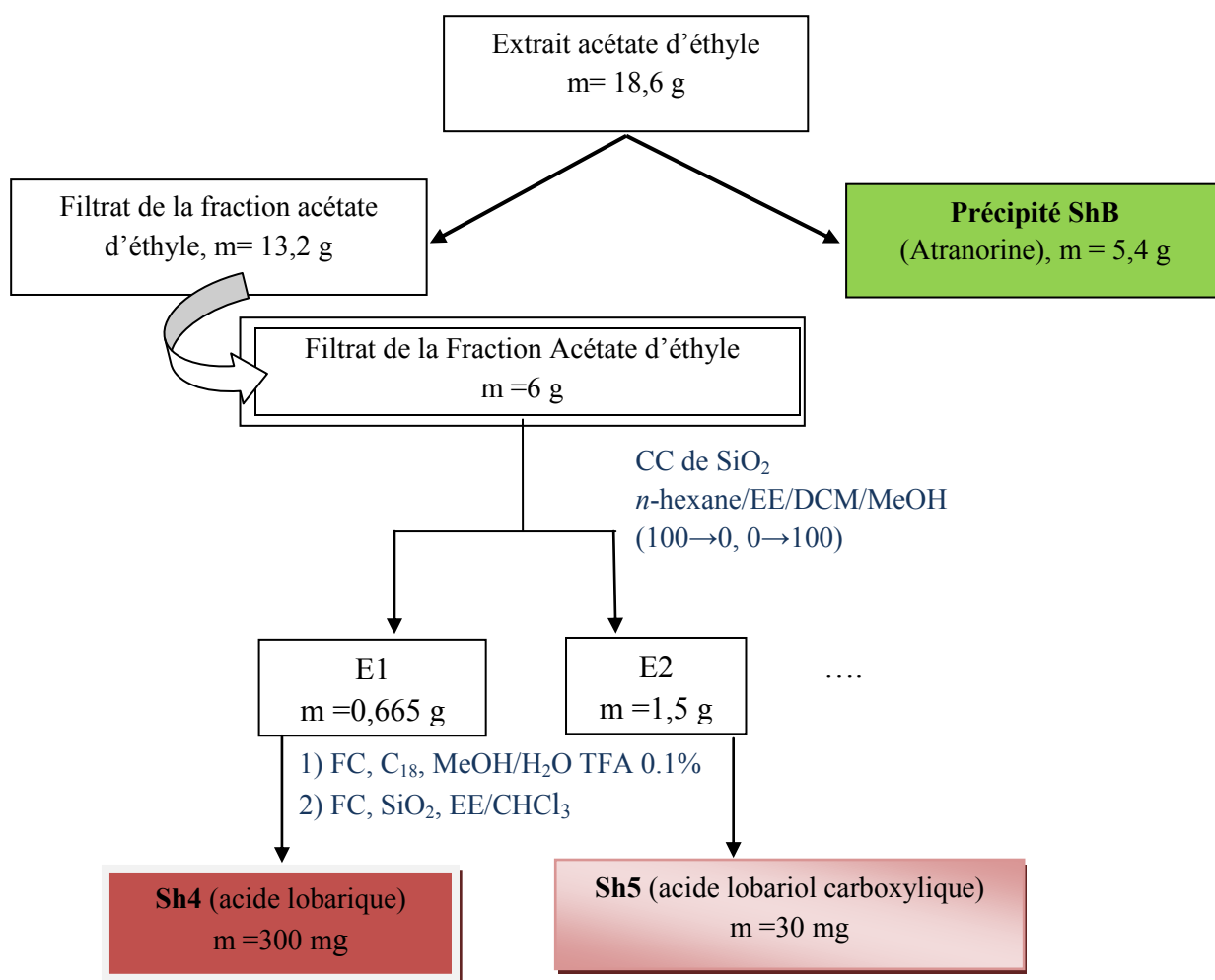


Figure 36. Schéma récapitulatif des purifications et des composés obtenus à partir de l'extrait acétate d'éthyle de *S. halei*

### 1.3 Métabolites isolés

Sept métabolites ont été isolés à partir des extraits *n*-hexane et acétate d'éthyle:

Composés	extraits
<b>ShA et ShB = atranorine</b>	précipité des extraits <i>n</i> -hexane et l'acétate d'éthyle
<b>Sh1 = MOC</b> <b>Sh2 = haematommate de méthyle</b> <b>Sh3 = haematommate d'éthyle</b>	<i>n</i> -hexane
<b>Sh4 = acide lobarique</b> <b>Sh5 = acide lobariol carboxylique*</b>	acétate d'éthyle

\*composé nouveau

L'identification structurale de ces composés est détaillée ci-après et ils seront présentés en fonction de leur similitude structurale.

### 1.3.1 Depside et composés monoaromatiques phénoliques

Les composés **ShA** et **ShB**, **Sh1**, **Sh2**, et **Sh3** sont des composés isolés à partir de la fraction *n*-hexane et acétate d'éthyle (fig.37).

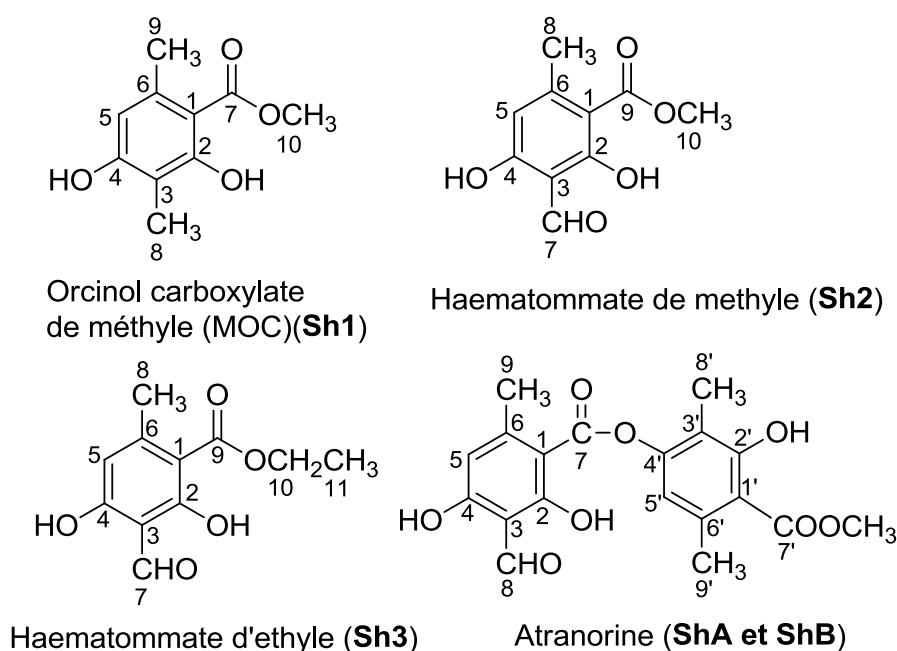


Figure 37. Structures des composés isolés à partir des fractions *n*-hexane et AcOEt

### Composé Sh1

Le spectre de masse haute résolution en impact électronique du composé **Sh1** fait apparaître un ion moléculaire  $[M]^+$  à  $m/z$  197,08 correspondant à la formule brute  $C_{10}H_{13}O_4$ . En RMN  $^1H$ , nous observons des signaux caractéristiques de deux fonctions méthyliques aromatiques à 1,94 et 2,36 ppm accompagnés d'un groupement méthoxy à 3,85 ppm. Le singulet à 6,28 ppm intégrant pour un proton indique la présence d'un proton aromatique tandis que les deux singulets à 10,11 et 11,62 ppm signalent la présence de deux fonctions hydroxyles. La RMN  $^{13}C$  confirme la présence de deux carbones portant les groupements méthyles à 7,96 et 23,4 ppm, un groupement méthoxy à 51,9 ppm et surtout une fonction carbonyle à 171,7 ppm. Ces déplacements sont en tous points comparables à ceux d'un composé fréquemment retrouvé dans les lichens ; l'**orcinol carboxylate de méthyle (MOC)**.



## Composé Sh2

Le spectre de masse haute résolution en électrospray du composé **Sh2** fait apparaître un ion moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  233,04 qui correspond à la formule brute  $C_{10}H_{10}O_5$ . Sur le spectre RMN<sup>1</sup>H, un des groupements méthyle est remplacé par une fonction aldéhyde à 10,34 ppm portée par un carbone dont le déplacement en RMN<sup>13</sup>C est 193,9 ppm. Ce composé est **l'haematommate de méthyle**.

## Composé Sh3

C'est un composé proche du précédent dont la formule brute obtenue par électrospray est  $C_{11}H_{12}O_5$  (ion moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  247,06). Sur le spectre RMN<sup>1</sup>H, le remplacement du groupement méthoxy par un groupement éthoxy est visible à 1,43 ppm. Il s'agit de **l'haematommate d'éthyle**.

## Composé ShA et ShB

Le composé, présent dans les précipités A et B, a été obtenu à partir des fractions *n*-hexane et acétate d'éthyle par précipitation à froid et après évaporation des solvants. Il se trouve en grande quantité dans le lichen puisqu'à partir des précipités, 25,7 g ont été isolés ce qui représente au moins 2,5% du poids sec du lichen. Les données bibliographiques sur le genre *Stereocaulon* laissent à penser qu'il s'agit du depside atranorine et l'ion moléculaire  $m/z$  397,09  $[M+Na]$  observé sur le spectre de masse haute résolution nous indique que le composé a pour formule brute  $C_{19}H_{18}O_8$ . Le spectre RMN<sup>1</sup>H montre la présence conjointe des signaux du MOC et du haematommate de méthyle sans le déplacement du groupement méthoxy de haematommate d'éthyle. Il s'agit ainsi de **l'atranorine**, depside formé par l'estérification du MOC et de l'haematommate.

### 1.3.2 Depsidone Sh4 et diphényléther Sh5 (l'acide lobarique et l'acide lobariol carboxylique)

Les composés **Sh4** et **Sh5** ont été isolés à partir de la fraction acétate d'éthyle et ils ont été purifiés par trois chromatographies successives utilisant comme phases stationnaires la silice et la silice greffée (cf partie expérimentale 4.1.2.2).

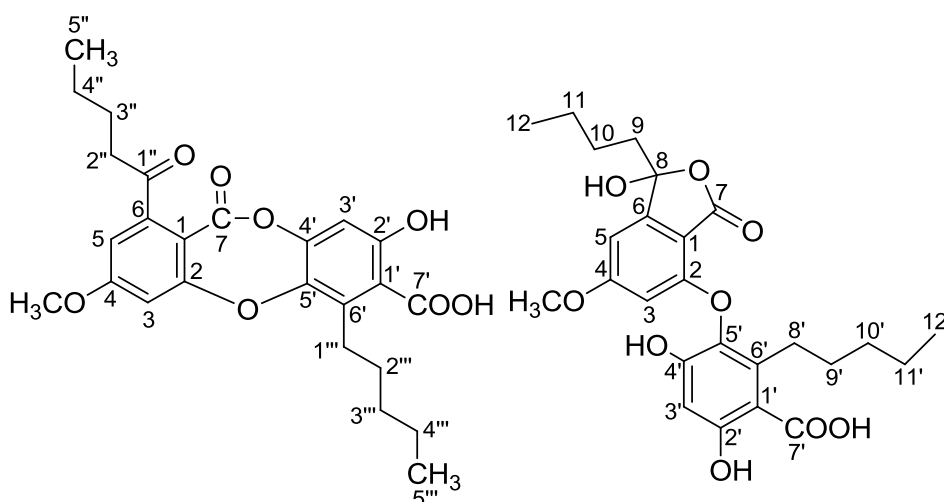


Figure 38. Structure de l'acide lobarique (Sh4) (à gauche) et de l'acide lobaric carboxylique (Sh5)

Le composé **Sh4** est un composé présent en assez grande quantité puisque 300 mg ont été obtenus. L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en électrospray met en évidence l'ion moléculaire  $[M-H]^-$  à  $m/z$  455,1711 correspondant à la formule brute  $C_{25}H_{27}O_8$ .

Son spectre RMN  $^1H$  montre la présence de longues chaînes aliphatiques ( $CH_2$  et  $CH_3$  aliphatiques entre 0,9 et 3,29 ppm). Le singulet à 6,79 et le double doublet à 7,03 ppm ( $J=2,4, 2,5$  Hz) indiquent la présence de trois hydrogènes portés par deux noyaux aromatiques dont l'un est par ailleurs totalement substitué. Un signal correspondant à un groupe méthoxyle a été observé à 4,00 ppm (3H, s) et peut être situé en position C-4. L'examen du spectre bidimensionnel HMBC (figures 39-40) permet de distinguer l'environnement respectif de ces protons: le proton aromatique (non couplé) à 6,79 ppm corrèle avec les carbones C-1' ( $\delta$  111,35); C-2' ( $\delta$  159,92); C-4' ( $\delta$  148,29); C-5' ( $\delta$  141,60) et C-7' ( $\delta$  171,18). Les 2 protons aromatiques à 7,03 ppm corrélient avec les carbones C-2 ( $\delta$  162,83); C-3 ( $\delta$  106,04); C-4 ( $\delta$  164,58) et C-5 ( $\delta$  111,33).

Ces signaux de longues chaînes ont également été confirmés par  $^1H$ - $^1H$  COSY, HMBC et HMQC (cf partie expérimentale sec. 7). La chaîne latérale pentyl-carboxylée montre une corrélation entre un groupe méthyle H-5'' ( $\delta$  0,95) le C-4'' ( $\delta$  22,29) et le C-3'' ( $\delta$  25,79); le méthylène H-4'' ( $\delta$  1,43) est corrélié avec C-3'' ( $\delta$  25,79) et C-2'' ( $\delta$  41,34); les méthylènes H-3'' ( $\delta$  1,68) et H-9 ( $\delta$  2,88) sont respectivement couplés avec C-8 ( $\delta$  202,38) et C-3'' ( $\delta$  25,79). Le chaîne pentyle est composée d'un groupe méthyle H-5''' ( $\delta$  0,95) et du méthylène H-4''' ( $\delta$  1,43) qui est corrélié avec C-2''' ( $\delta$  31,00) et C-4''' ( $\delta$  21,83); du méthylène H-3''' ( $\delta$  1,55) couplé avec C-1''' ( $\delta$  27,79), C-2''' ( $\delta$  31,00) et C-5''' ( $\delta$  13,45); et enfin du méthylène H-2''' ( $\delta$

1,68) couplé avec C-1''' ( $\delta$  27,79) et C-4''' ( $\delta$  21,83). **Sh4** est donc identifié à l'**acide lobarique** déjà identifié dans 8 espèces de Stereocaulons (cf annexe).

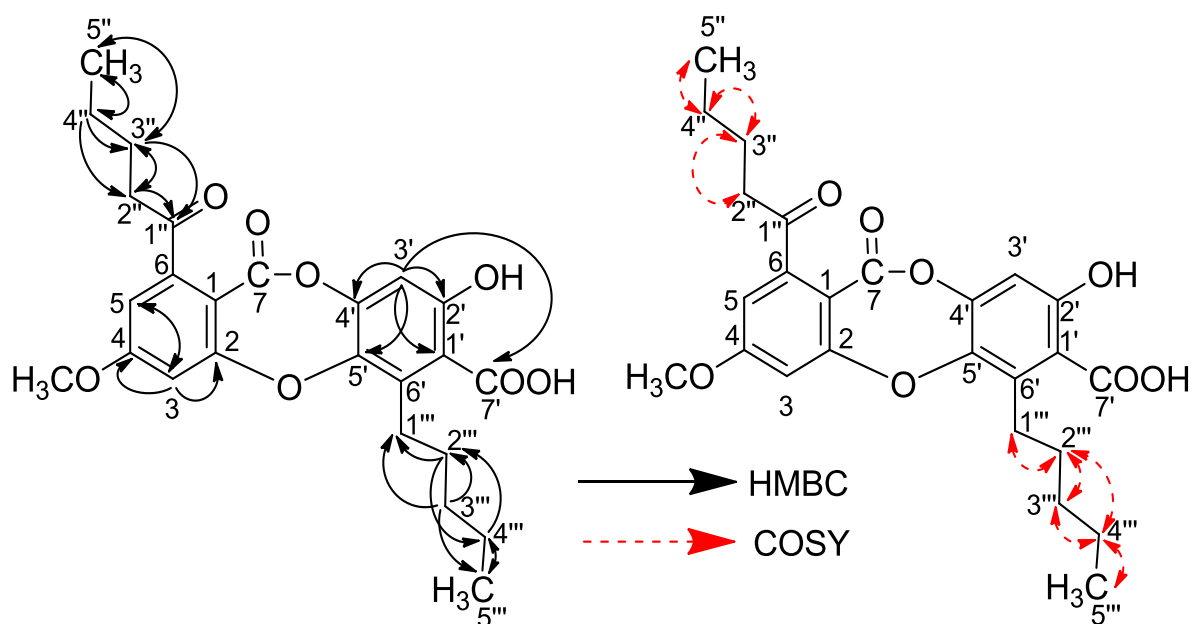


Figure 39. Corrélations C-H pour les protons aromatiques d'après la RMN 2D de l'acide lobarique

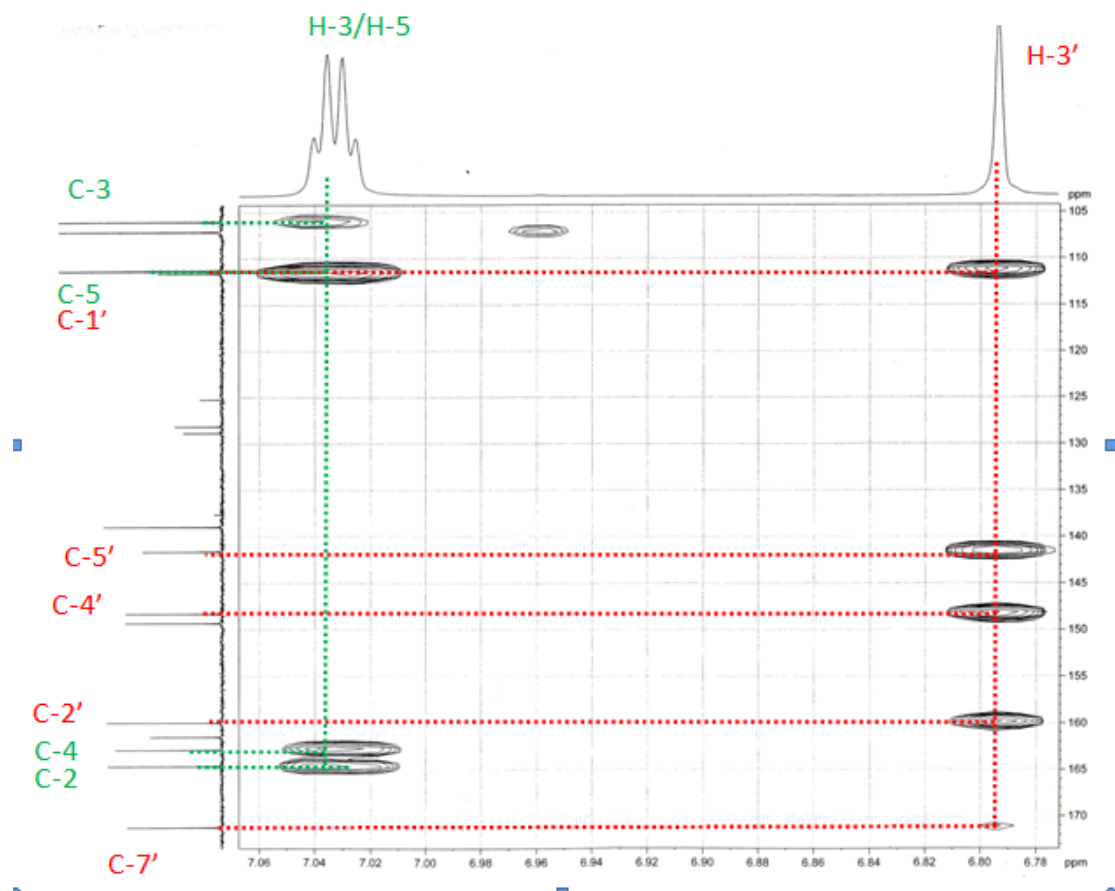


Figure 40. Agrandissement du spectre HMBC (500 MHz; acétone) de Sh4

## Sh5

Le composé **Sh5** a été obtenu sous forme d'un solide brun en quantité 10 fois moins importante que l'acide lobarique. L'enregistrement de son spectre de masse haute résolution permet de lui attribuer la formule brute  $C_{25}H_{29}O_9$  correspondant à une perte d'eau sur la molécule d'acide lobarique.

Le spectre RMN  $^1H$  indique la présence de signaux pour les trois protons aromatiques ( $\delta$  6,09 ; 6,51 et 6,64), un groupe méthoxy ( $\delta$  3,80) et deux groupes méthyle ( $\delta$  0,75 et 0,89). Un signal multiplet à  $\delta$  1,17-1,35 correspondant à 10 H du groupe méthylène suggère la présence de chaînes aliphatiques. L'expérience RMN  $^1H$ - $^1H$  COSY confirme la présence de chaînes latérales butyle (C-9 à C-12) et pentyle (C-8' à C-12'). La structure complète a été établie à l'aide d'une expérience HMBC (fig. 41) avec les connectivités suivantes: aromatique H-3 ( $\delta$  6,09) avec C-1 ( $\delta$  106,61), C-2 ( $\delta$  157,54) et C-4 ( $\delta$  167,75); aromatique H-5 ( $\delta$  6,64) avec C-3 ( $\delta$  101,85) et C-8 ( $\delta$  107,31) et aromatiques H-3' ( $\delta$  6,51) avec C-1' ( $\delta$  103,68) et C-2' ( $\delta$  163,54). La chaîne latérale hydroxybutyle présente les corrélations suivantes H-12 ( $\delta$  0,75) avec C-11 ( $\delta$  21,96) et C-10 ( $\delta$  32,11); les méthylènes H-10 ( $\delta$  1,17) et H-9 ( $\delta$  2 à 2,2) avec C-11 ( $\delta$  21,96) et C-10 ( $\delta$  32,11) respectivement. La chaîne pentyle montre que H-12' ( $\delta$  0,89) corrèle avec C-10' ( $\delta$  25,16) et C-11' ( $\delta$  22,43); le méthylène H-11' ( $\delta$  1,35) avec C-9' ( $\delta$  30,25), C-10' ( $\delta$  25,16) et C-12' ( $\delta$  13,83). La substitution du C-8 par la chaîne latérale butyle a été révélée par une corrélation HMBC entre H-5 et C-8 et une corrélation NOESY entre H-5 et H<sub>2</sub>-9/H<sub>2</sub>-10. La connexion entre C-2 et C-5' par une liaison éther a été confirmée par une corrélation NOESY entre H-3 et H<sub>2</sub>-8'.

**Sh5** correspond donc à l'**acide lobariol carboxylique**, décrit pour la première fois en 1935 par Asahina, Y., Nonomura, S., dans le cadre d'un schéma oxydatif à partir de l'acide lobarique (Asahina and Nonomura 1935). Compte tenu que ce composé est pour la première fois isolé à partir d'une source naturelle, nous avons accordé une attention particulière à son analyse structurale et avons vérifié qu'il ne s'agissait pas d'un artefact.

Dans  $CDCl_3$  en solution à 296°K, le composé **Sh5** apparaît sous forme d'un mélange de deux conformères dans les spectres RMN par l'élargissement des deux signaux H-5 et H-3. L'enregistrement à plusieurs températures des spectres RMN démontre ce phénomène (figure 42). Les spectres RMN  $^1H$  ont été enregistrés à basse température (203°K) dans le méthanol- $d_4$  et deux ensembles de massifs dans un rapport 65/35 ont été observés, ce qui suggère la

coexistence de deux rotamères autour de la liaison éther. Le passage du signal à C-8 à ( $\delta$ c38,28) dans le spectre HMQC a confirmé l'ouverture et la cyclisation d'un cycle lactone.

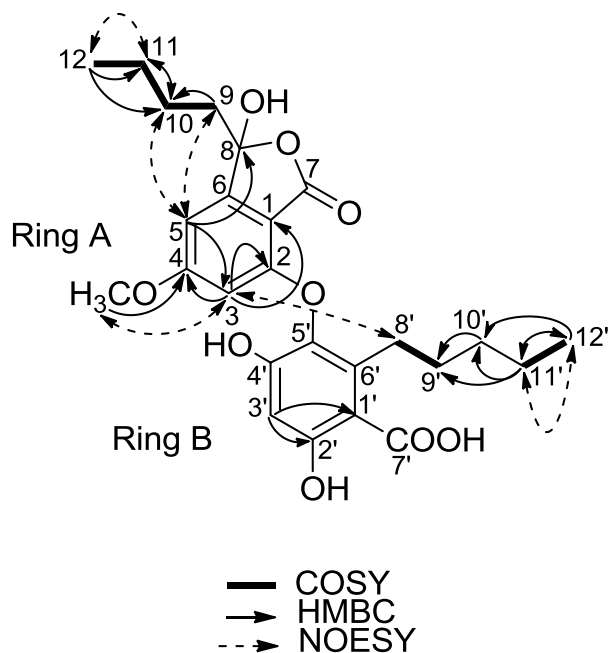


Figure 41. Corrélations C-H pour les protons aromatiques de RMN 2D pour Sh5

ffmacme678( sinbandith).006.esp

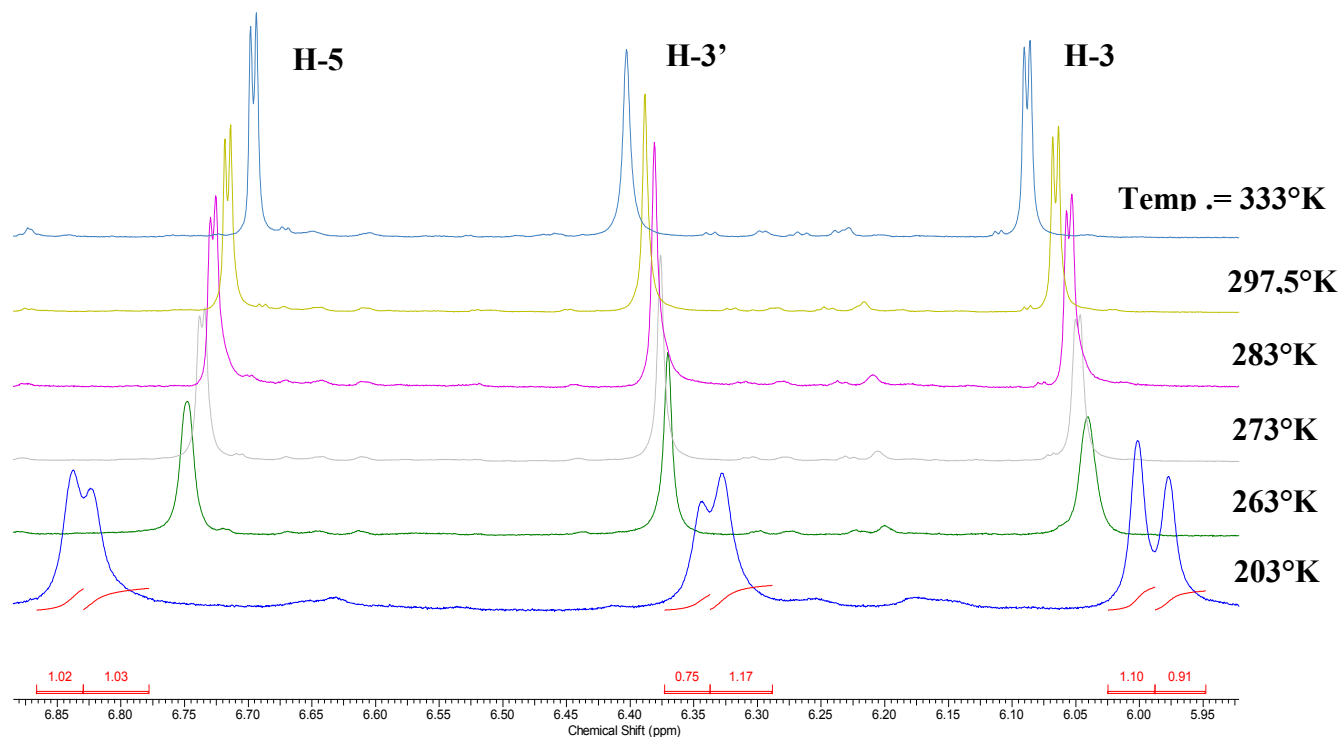


Figure 42. Expansion de spectres RMN  $^1\text{H}$  de Sh5 à différentes températures (en MeOD)

Trois modèles moléculaires principaux ont été retenus suite à une analyse de simulation en dynamique moléculaire (DM) à l'aide d'une analyse typologique menée par Olivier Delalande (UMR 6026 Interactions Cellulaires et Moléculaires, Université de Rennes 1) (Figure 43). Les deux structures les plus stables (énergie interne de Yamber3) représentent entre 30 % et 40 % de la population moléculaire pour cette structure selon l'un ou l'autre des 2 modèles de simulation de DM. La géométrie de ces deux conformères (forme 1 et forme 2) diverge selon les angles de torsion  $\theta_1/\theta_2$  ( $-90,78^\circ/-162,57^\circ$  et  $99,02^\circ/166,81^\circ$ ). Il convient de remarquer qu'un changement conformationnel spontané (forme 3) est apparu lors de la deuxième simulation de DM par rapport à la conformation initiale de l'état le plus favorable (forme 2) à la mi-temps de la trajectoire. Le quatrième conformère possible présentant un angle de torsion  $-\theta_1/\theta_2$  n'a pas été observé. Ainsi la forme 1 correspond au composé présent sur les spectres RMN à un ratio de 65% dans le mélange tandis que la forme 2 possédant l'énergie la moins basse correspond au rotamère 2 et est le composé visible en RMN dans la proportion de 35 % (figure 43).

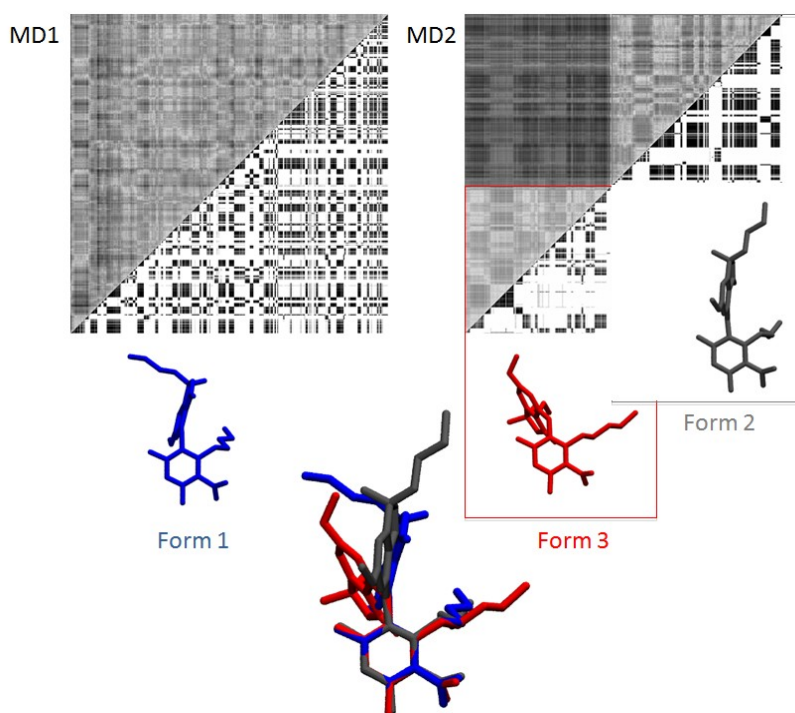


Figure 43. Modélisation moléculaire réalisée sur l'acide lobariol carboxylique Sh5

Les éthers diphényliques ne sont pas si fréquents dans les lichens par rapport aux depsides et depsidones et la plupart d'entre eux sont liés par la liaison éther au niveau de la position en méta sur le noyau B. Par conséquent, ils sont souvent liés à des depsidones et sont appelés éthers de diphényle (Comber, Sargent et al. 1989; Huneck 2001). Jusqu'à présent, la co-occurrence d'une depsidone ayant un groupe carbonyle en  $\alpha$ -position de la chaîne latérale liée au cycle A avec un diphényléther formant un groupe lactol a été rapportée sporadiquement comme pour la loxodine et la norlobaridone (Foo and Galloway 1979) (fig. 44).

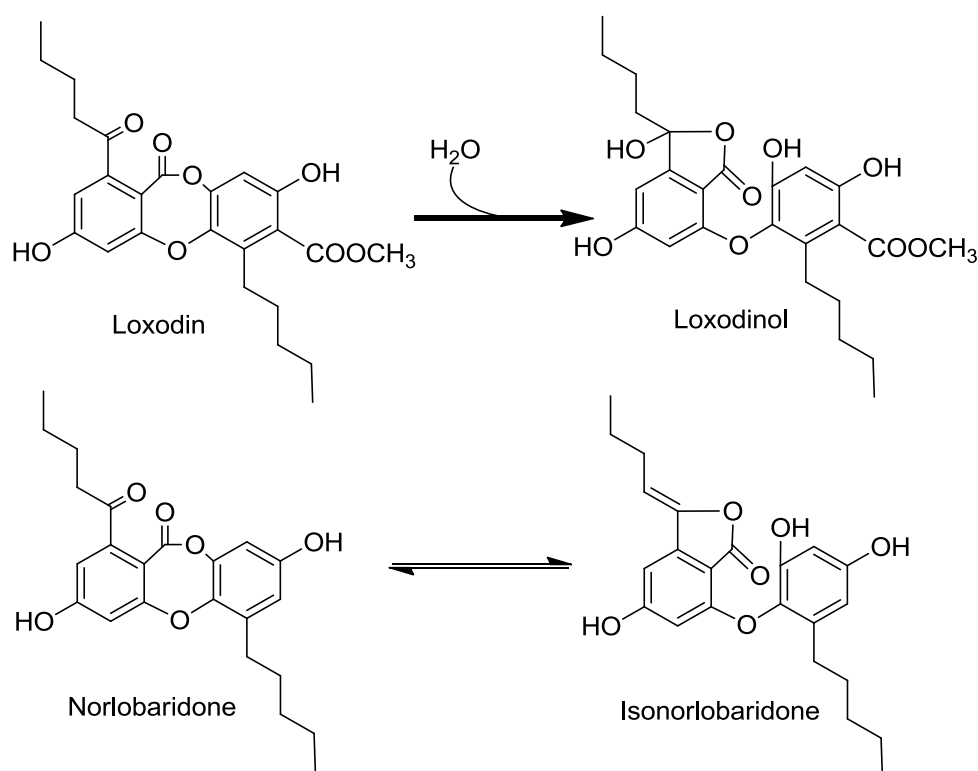
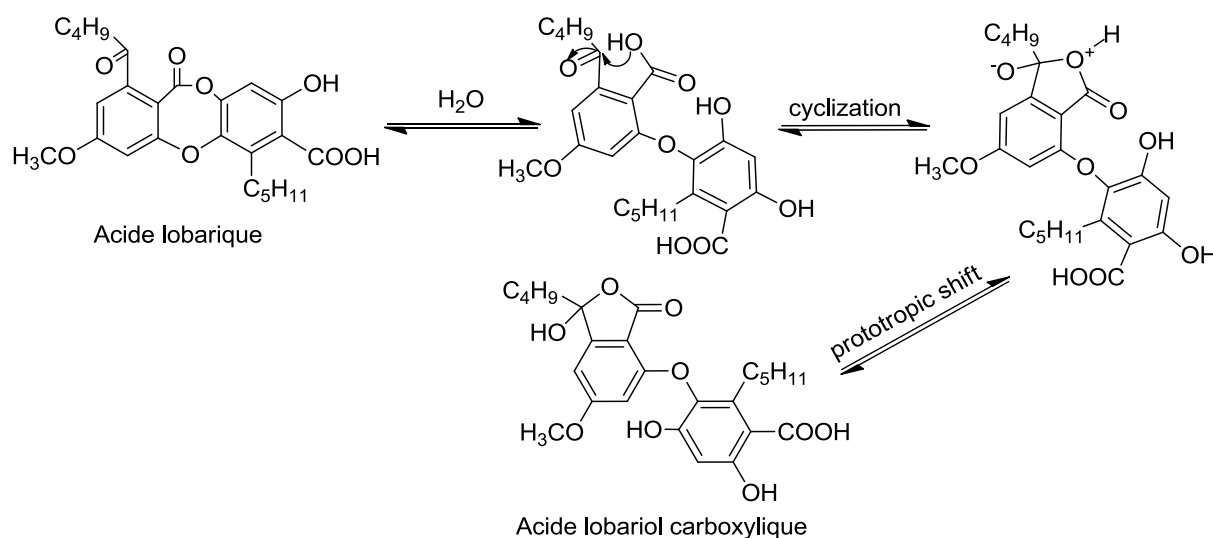


Figure44. Relation proposée entre les depsidones (loxodine et norlobaridone) et les éthers de diphényle (loxodinol et isonorlobaridone) (Chooi 2008).

Dans notre étude, la quantité importante de **Sh5** suggère qu'il est naturellement présent. Nous avons vérifié ce point en réalisant une comparaison par CCM des extraits immédiatement obtenus avec l'hexane et l'acétate d'éthyle. Certains diphényléthers ont pu être formés lors de l'extraction (Milot, Tomasi et al. 2008) ou par le traitement de depsidones utilisant une solution chaude de soude (Asahina and Nonomura 1935). En outre, afin de vérifier que **Sh5** n'est pas un artefact d'isolement, le même protocole d'extraction (*n*-hexane, puis AcOEt) a été réalisé en parallèle sur le lichen et l'acide lobarique, dans deux conditions différentes, (à température ambiante et à  $+50^{\circ}\text{C}$ ). Ensuite, les extraits ont été analysés par

CCM. À la température ambiante et à 50°C, un spot identique a été visualisé dans les extraits avec facteur de rétention ( $R_f = 0.44$ , éluant : Tol/AcOEt/AF 70:25:5) correspondant à **Sh5**, tandis que l'acide lobarique sous ces conditions est demeuré inchangé. Il est donc conclu que l'acide lobariol-carboxylique est un métabolite naturel de ce lichen et une relation de biosynthèse peut être proposée (fig. 45) sur la base des voies déjà décrites (Foo and Galloway 1979; Chooi 2008).

Le diphenyléther **Sh5** est censé résulter de l'ouverture du cycle formant la depsidone par hydrolyse de la liaison ester de l'acide lobarique (fig. 45). Celle-ci est suivie d'une attaque nucléophile et d'un réarrangement prototropique qui aboutit à la formation du composé **Sh5**. Contrairement à ce qui est décrit pour la biosynthèse de la loxodine et de la norlobaridone, il n'y a respectivement pas de décarboxylation ou de O-méthylation (Chooi 2008). Ces molécules sont d'un grand intérêt pour comprendre la biogenèse de ces composés, et les éthers de diphenyle connexes des depsidones conloxodine et conorlobaridone isolées à partir de *Xanthoparmelia xanthosorediata* (Begg, Chester et al. 1979) devraient être recherchés dans les extraits de ce lichen.



**Figure 45. Relation biogénétique proposée entre l'acide lobarique (Depsidone) et l'acide lobariol carboxylique (diphényléther)**



### 1.3.3 Discussion sur les composés isolés de *S. halei*

L'étude phytochimique menée sur ce lichen nous a permis d'isoler et d'identifier 7 composés de structures attendues chez les lichens. Deux composés majoritaires sont représentatifs du type depsidone (acide lobarique) et du type depside (atranorine). Ce depside est ici particulièrement abondant puisqu'il représente à lui seul 2,5% de la quantité totale extractible à partir du lichen. Surtout présent dans l'extrait le plus apolaire (*n*-hexane), il n'est pas étonnant que nous ayons également obtenu des composés mono-aromatiques (MOC, méthyl- et ethyl-haematommates) pouvant être formés suite à hydrolyse de la liaison ester de l'atranorine. Un nouveau composé, **Sh5** qui correspond à l'éther diphenyle de l'acide lobarique été plus particulièrement étudié d'un point de vue structural. Il se présente en effet sous forme de rotamères dont l'analyse RMN des spectres enregistrés à plusieurs températures permet de proposer des structures de conformères qui sont en accord avec des études de modélisation moléculaire qui font apparaître essentiellement 2 conformères dominants. Cette structure s'inscrit aussi dans un schéma de biosynthèse en lien avec l'acide lobarique qui est une depsidone, elle aussi trouvée dans plusieurs espèces de lichens. Précédemment, un diphenyleéther très similaire à celui-ci, le sakisacaulon A (fig.46), a également été décrit avec l'acide lobarique dans *Stereocaulon sasakii* (Morita, Tsuchiya et al. 2009). De même, deux pseudodepsidones méthylées sur le OH-8 isolées à partir de *Stereocaulon alpinum* ont également été décrites succinctement (Seo, Sohn et al. 2009). Ces deux composés pourraient provenir de la méthylation du sakisacaulon et de l'acide lobariol carboxylique après extraction du lichen par le méthanol.

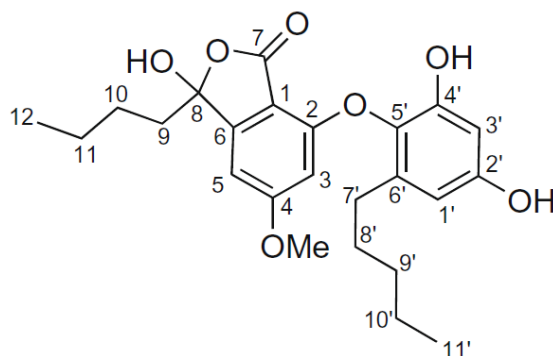


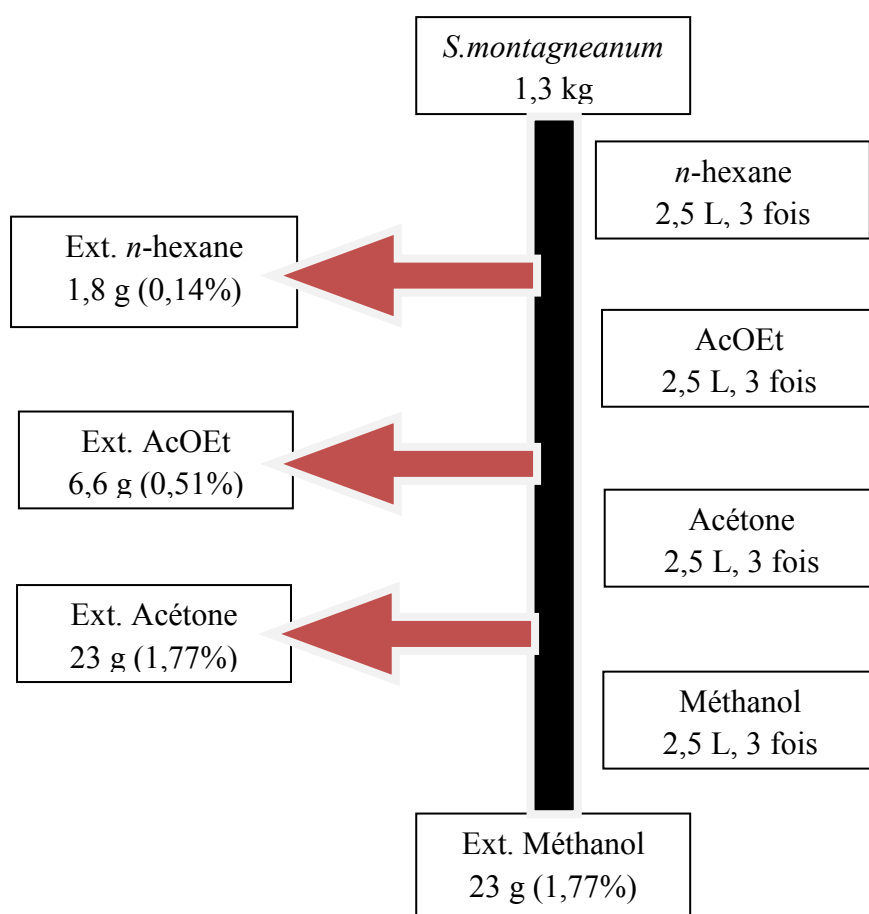
Figure46. Structure du sakisacaulon A isolé à partir *Stereocaulon sasakii* (Morita et al. 2009).

Le deuxième lichen (*S. montagneanum*) que nous avons récolté lors de notre retour en Indonésie dans le cadre de ce travail de doctorat a fait l'objet d'une étude botanique et phytochimique approfondie. Nous présentons ici les travaux menés sur les fractions organiques d'une part et d'autre part les travaux menés sur les fractions aqueuses résiduelles

## 2 Etude phytochimique des fractions organiques de *Stereocaulon montagneanum* Lamb.

### 2.1 Extraction

Le lichen trié et séché à l'air (1,3 kg) a été broyé puis a été placé au contact des solvants. L'extraction a été réalisée à froid par macération et les quatre solvants de polarité croissante utilisés ont été le *n*-hexane, l'acétate d'éthyle, l'acétone et le méthanol (Figure 47). Quatre extraits ont été obtenus : l'extrait *n*-hexane, l'extrait acétate d'éthyle (AcOEt), l'extrait acétone et l'extrait méthanolique.



**Figure 47. Schéma d'extraction de *S. montagneanum*. Obtention des extraits**

Le processus de macération se déroule sur deux jours pour chacun des solvants avec trois extractions à chaque fois. Chaque extrait a été concentré *in vacuo* et 3 précipités (précipités **SmoA** (0,2 g), **SmoB** (5 g), et **SmoC** (10 g)) se sont respectivement formés lors de l'évaporation des solvants à température ambiante au sein des extraits *n*-hexane, acétate d'éthyle, et acétone.

## 2.2 Purification

La comparaison qualitative de chacun des extraits est effectuée par comparaison des profils en CCM. Les extraits ayant un profil comparable sont réunis avant d'être purifiés (fig. 48-50).

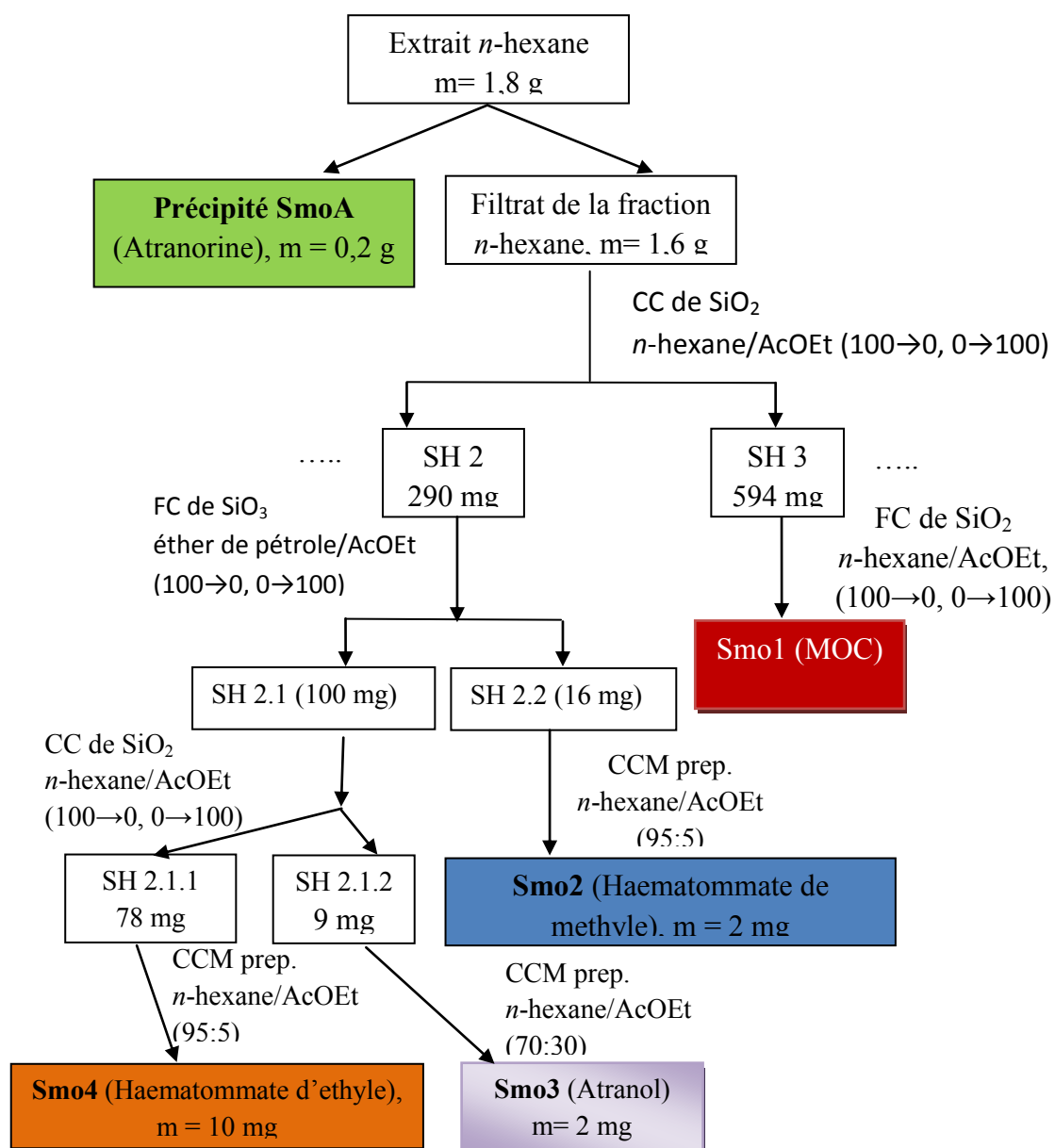


Figure 48. Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait *n*-hexane

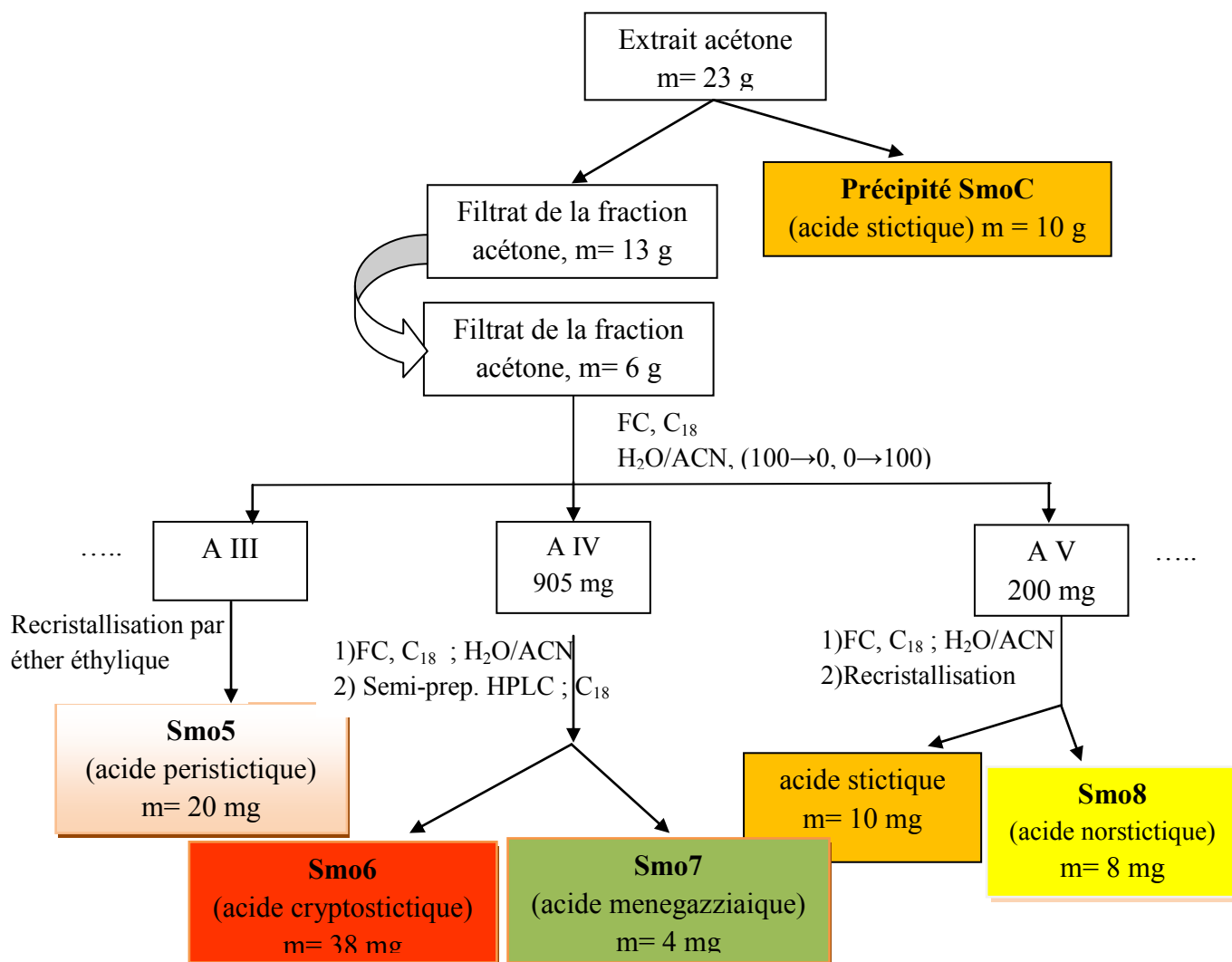


Figure49. Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait acétone

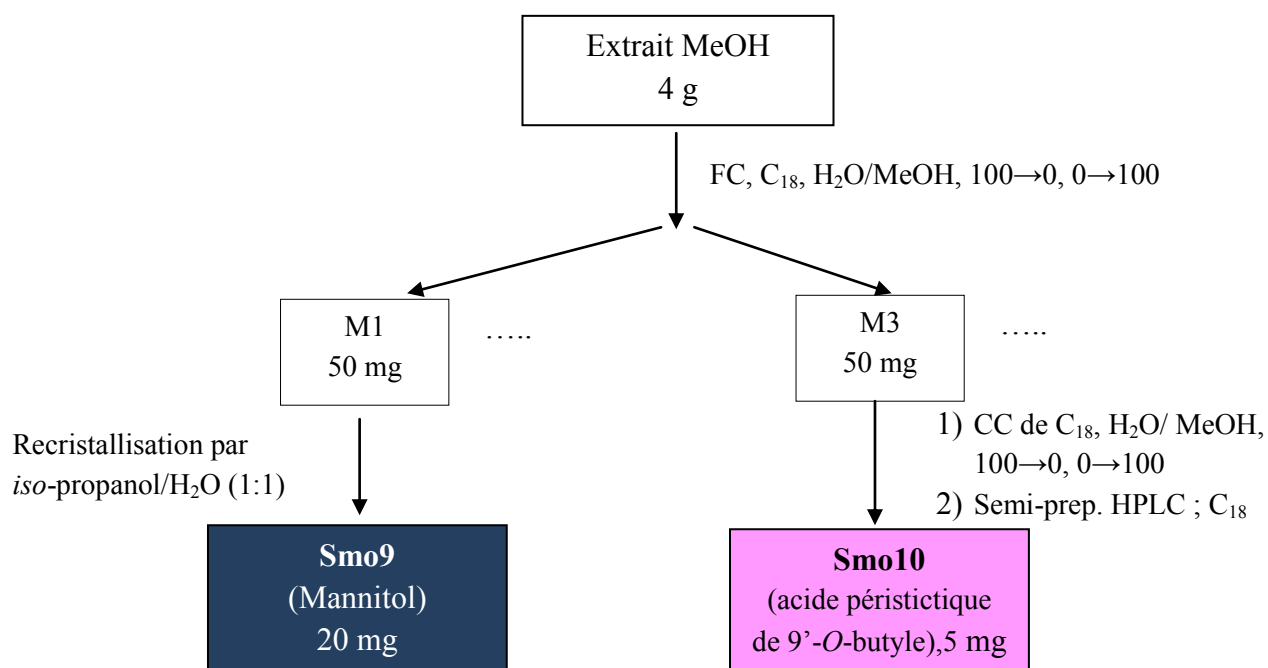


Figure 50. Schéma récapitulatif des purifications et composés obtenus à partir de l'extrait méthanol

### 2.3 Métabolites isolés

Douze métabolites ont été isolés de *Stereocaulon montagneanum* :

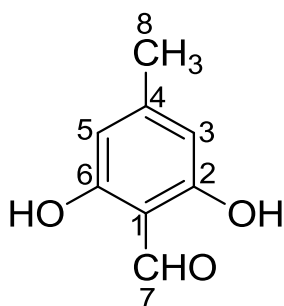
Composées	extraits
<b>SmoA et SmoB= atranorine</b>	précipité des extraits <i>n</i> -hexane et l'acétate d'éthyle
<b>Smo1= MOC</b> <b>Smo2= haematommate de méthyle</b> <b>Smo3= atranol</b> <b>Smo4= haematommate d'éthyle</b>	<i>n</i> -hexane
<b>SmoC = acide stictique</b> <b>Smo5 = acide périctictique</b> <b>Smo6 = acide cryptostictique</b> <b>Smo7 = acide ménégazziaïque</b> <b>Smo8 = acide norstictique</b>	acétone
<b>Smo 9 = mannitol</b> <b>Smo10= acide périctictique de 9'-<i>O</i>-butyle *</b>	méthanol

\*composé nouveau

L'identification structurale de ces composés est détaillée ci-après et ils seront présentés en fonction de leur similitude structurale.

#### 2.3.1 Atranorine et composés apparentés

Dans la fraction la plus apolaire, plusieurs composés ont été retrouvés après chromatographie (**Smo1, Smo2, Smo3** et **Smo4**). L'analyse des signaux fournis par le spectre RMN<sup>1</sup>H de trois de ces composés (**Smo1, Smo2, et Smo3**) a montré qu'ils étaient identiques à ceux obtenus pour les produits **Sh1, Sh2** et **Sh3** isolés à partir de *S. halei*. Ainsi, par comparaison des spectres obtenus, nous pouvons conclure que les fractions *n*-hexane et AcOEt de *S. montagneanum* contiennent de l'**atranorine (Smo A et B)**, de l'**orcinol carboxylate de méthyle (Smo1)**, de l'**haematommate de méthyle (Smo2)** et de l'**haematommate d'éthyle (Smo4)**.



**Figure 51. Structure de l'atranol (Smo3)**

Le composé **Smo3** (2 mg) obtenu sous forme de cristaux jaunes a été purifié en enchainant différentes techniques chromatographiques (chromatographie sur silice, CC de silice et CCM préparative). Le spectre de masse haute résolution obtenu par électrospray du composé **Smo3** fait apparaître un ion moléculaire  $[M+Na]^+$  à  $m/z$  175,0376 correspondant à la formule brute  $C_8H_8O_3Na$ . En RMN  $^1H$ , nous observons des signaux caractéristiques d'une fonction méthylique aromatique à 2,46 ppm accompagnés de la présence d'un groupement aldéhyde à 10,00 ppm. Le singulet à 6,14 ppm intégrant pour deux protons indique la présence deux protons aromatiques tandis que la présence d'un singulet à 12,31 ppm évoque la présence d'une fonction phénol. Le spectre RMN  $^{13}C$  nous confirme la présence d'un carbone portant un groupement méthyle à 35,49 ppm, deux groupements hydroxyles à 161,62 ppm et surtout une fonction carbonyle à 191,29 ppm. Ces déplacements sont en tous points comparables à ceux d'un composé retrouvé dans d'autres lichens ; l'**atranol** (fig. 51)(Huneck and Yoshimura 1996).

### 2.3.2 Les depsidones

A partir du précipité **SmoC** formé après évaporation de l'acétone, un composé a été purifié par recristallisation dans AcOEt. Ce composé est une poudre blanche en quantité très importante dans le lichen puisqu'il représente au moins 10 g (soit 0,77 % du poids du lichen en matière sèche). L'analyse par spectrométrie de masse haute résolution en électrospray en mode négatif a permis de déduire une formule brute correspondant à  $C_{19}H_{13}O_9$  avec un ion moléculaire à  $m/z$  385,0567  $[M-H]^-$ . La coloration en jaune de ce composé sur plaque de CCM après pulvérisation de l'anisaldéhyde sulfurique nous oriente vers une depsidone avec un noyau lactonique. En RMN $^1H$ , nous observons les signaux caractéristiques de deux fonctions méthyliques aromatiques à 2,18 et 2,48 ppm et le signal d'une fonction

méthoxylique à 3,90 ppm. Les singulets à 6,64 et 7,08 ppm indiquent la présence de deux hydrogènes portés par un noyau aromatique. Enfin, le signal à 10,45 ppm signe la présence d'une fonction aldéhydique. En RMN<sup>13</sup>C trois signaux correspondant à une fonction aldéhydique à 186,9 ppm et deux fonctions carbonyles à 160,9 et 163,3 ppm confirment la présence d'un noyau lactone et du pont ester présent dans les depsidones. La comparaison de ces données spectrales avec celles de la littérature nous permet d'identifier sans ambiguïté **l'acide stictique** qui est un métabolite retrouvé de façon récurrente dans certains *Stereocaulons* comme indiqué dans le tableau récapitulatif présenté dans l'annexe 3.

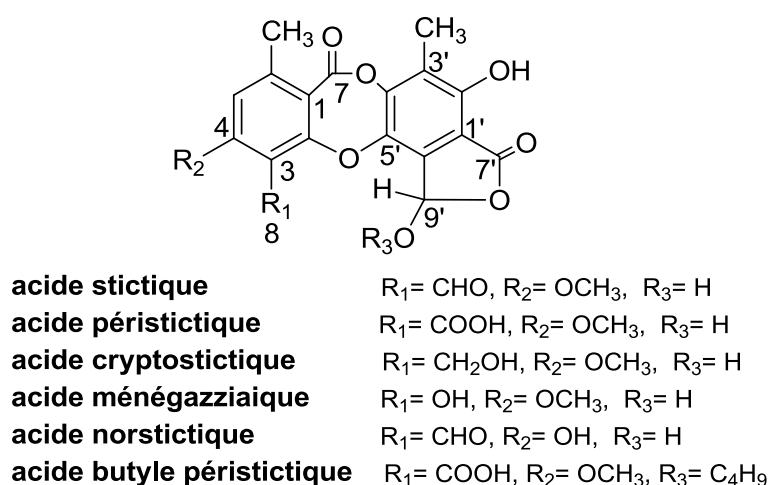


Figure 52. Structure de l'acide stictique et de ses dérivés

A partir du filtrat acétonique, nous avons isolé cinq composés proches de l'acide stictique c'est à dire des depsidones possédant un noyau orcinol (R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>OH) ou β-orsinol présentant des variations dans le degré d'oxydation du substituant en C-3 (i.e. R<sub>1</sub> = CH<sub>2</sub>OH, CHO ou COOH), la substitution du C-4 étant généralement un OCH<sub>3</sub> et dans le cas de l'acide norstictique un OH. La RMN <sup>1</sup>H de **l'acide périctictique (Smo5)** a montré des similitudes avec l'acide stictique (**SmoC**) à l'exception de l'absence du signal aldéhydique à δ<sub>H</sub> 10,45 ppm. Parallèlement, la RMN <sup>13</sup>C a montré l'apparition d'un groupe carboxylate à δ<sub>C</sub> 169,28, ce qui indique que nous sommes en présence de l'acide périctictique dont l'aldéhyde en C-8 de l'acide stictique est oxydé en COOH. **L'acide cryptostictique (Smo6)** montre également le même phénomène, si ce n'est que la position en C-8 correspond à l'alcool méthylique (-CH<sub>2</sub>OH) avec la présence du signal large à δ<sub>H</sub> 4,68 (2H) au niveau des spectres RMN <sup>1</sup>H. Les spectres RMN <sup>13</sup>C et DEPT suggèrent également qu'il contient un méthylène à δ<sub>C</sub> 51,25. La ressemblance étroite de **l'acide ménégazziaïque (Smo7)** avec l'acide stictique est aussi



visible sur les spectres RMN  $^1\text{H}$  à l'exception du signal dû au proton formyle qui correspond à un proton phénolique ( $\delta_{\text{H}}$  10,14, 1H, large) tel que décrit par Hirayama (Hirayama, Fujikawa et al. 1976). Dans le spectre RMN  $^{13}\text{C}$ , le C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  151,35) est substitué par un groupe hydroxyle (-OH). **L'acide norstictique (Smo8)** présente un spectre qui correspond à la perte du méthyle pour le substituant en C-4 qui devient donc un groupe hydroxyle. La comparaison des données spectrales en RMN de ces composés est illustrée fig. 53 et détaillée dans le tableau 16.

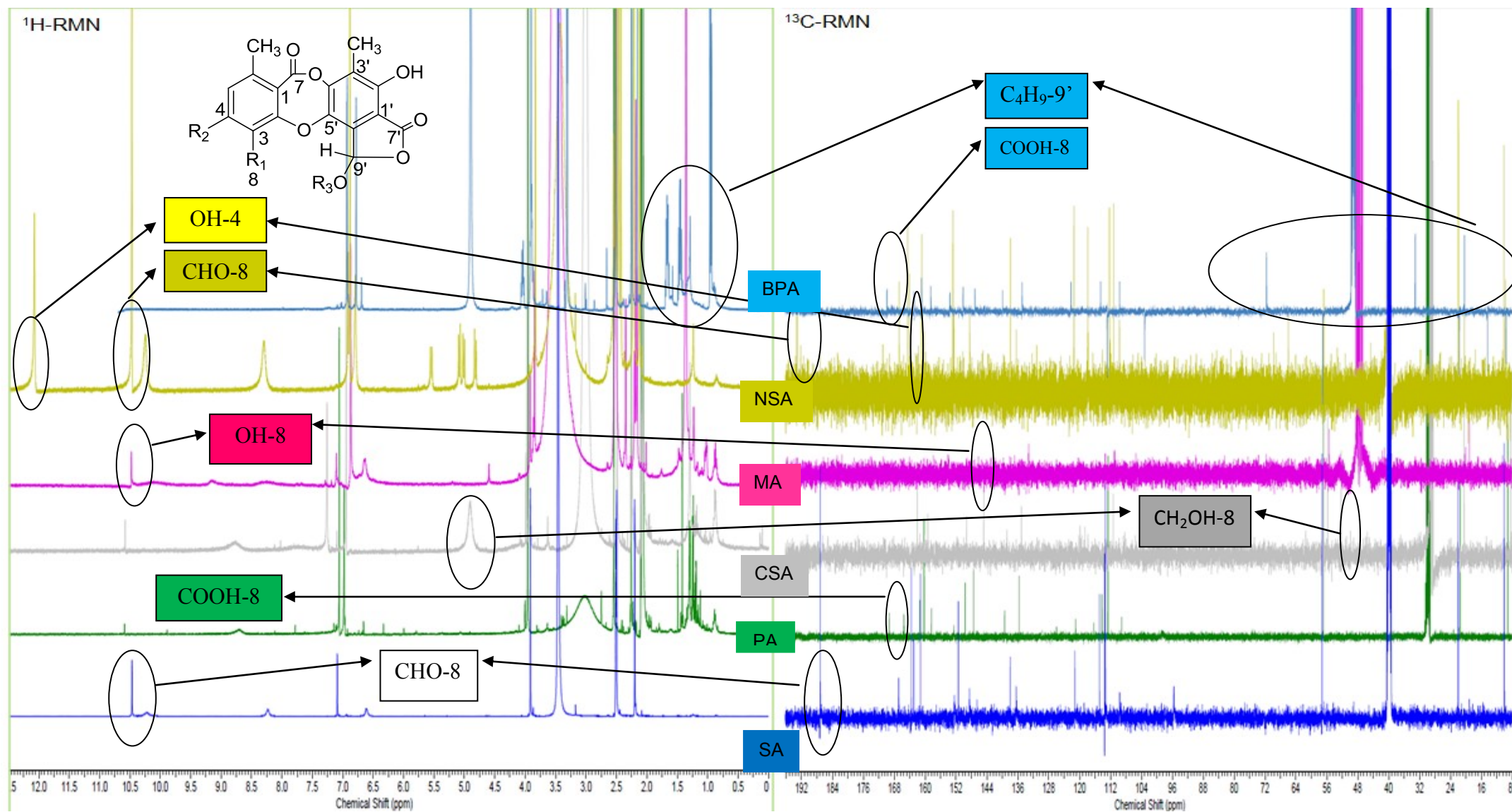


Figure 53. Spectres RMN comparés des dérivés de l'acide stictique (SA= acide stictique, PA= acide périctictique, CSA= acide cryptostictique, MA= acid ménégazziaïque, NSA= acide norstictique et BPA= acide périctictique de *o*-butyle)

**Tableau 16. Comparaison des données RMN des dérivés stictiques**

position	acide stictique (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		acide cryptostictique (500 MHz, Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> )		acide périctictique (500 MHz, Acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> )		acide norstictique (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		acide ménégazziaïque (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		acide périctictique de 9'- <i>O</i> -butyle (500 MHz, MeOD- <i>d</i> <sub>4</sub> )	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)
1	113.28	-	114.15	-	114.20	-	111.58	-	113.18	-	114.56	-
2	166.87	-	162.14	-	165.48	-	166.61	-	161.36	-	158.52	-
3	114.86	-	119.40	-	116.35	-	110.61	-	151.35	-	119.20	-
4	162.93	-	162.82	-	160.26	-	163.94	-	162.39	-	160.93	-
5	113.54	7.08 (1H,s)	112.10	6.94(1H,s)	112.67	7.05(1H,s)	117.32	6.88 (1H,s)	111.58	6.80 (1H,s)	112.86	6.93, s
6	151.39	-	145.62	-	147.43	-	152.24	-	148.22	-	147.13	-
7	161.23	-	160.04	-	158.39	-	160.28	-	160.67	-	162.84	-
8	187.17	10.45 (1H,s)	53.09	4.96 (2H,s)	169.28	-	192.61	10.50 (1H,s)	-	10.14 (1H,s)	168.66	-
9	22.00	2.46 (3H,s)	21.25	2.49 (3H,s)	21.45	2.54 (3H,s)	21.36	2.48 (3H,s)	19.75	2.36 (3H,s)	21.71	2.51, s
1'	109.66	-	109.06	-	109.14	-	109.12	-	108.02	-	109.67	-
2'	152.48	-	152.52	-	152.54	-	151.96	-	152.34	-	153.57	-
3'	121.26	-	120.72	-	121.02	-	120.90	-	120.31	-	122.23	-
4'	148.52	-	150.08	-	149.61	-	147.85	-	148.96	-	150.17	-
5'	137.96	-	139.58	-	139.43	-	135.81	-	139.10	-	139.94	-
6'	136.40	-	135.88	-	135.64	-	137.33	-	134.87	-	134.88	-
7'	163.58	-	169.27	-	161.33	-	163.49	-	163.01	-	169.88	-
8'	10.09	2.19 (3H,s)	9.15	2.22 (3H,s)	9.16	2.25 (3H,s)	9.85	2.20 (3H,s)	9.41	2.10 (3H,s)	14.39	2.25, s
9'	95.60	6.60 (1H,s)	98.01	7.28 (1H,s)	98.52	6.98 (1H,s)	94.58	6.79 (1H,s)	95.40	6.65 (1H,s)	103.15	6.78, s
10'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71.64	4.03, m
11'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	33.13	1.67, m
12'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20.36	1.44, m
13'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9.57	0.95, t (7.3)
OCH <sub>3</sub> -4	57.24	3.91 (3H,s)	56.57	3.94 (3H,s)	56.92	3.98 (3H,s)	-	-	56.68	3.90 (3H,s)	57.07	3.90, s
OH-4	-	-	-	-	-	-	-	12.10 (1H,s)	-	-	-	-
OH	-	8.22 (1H,s)	-	7.72 (1H,s)	-	-	-	-	-	-	-	-
OH	-	10.19 (1H,s)	-	8.76 (1H,s))	-	8.69 (1H,s)	-	-	-	-	-	-

Le composé **Smo9** (20 mg) a été isolé à partir de l'extrait méthanolique. Il s'agit d'un composé très polaire ( $R_f = 0,32$  dans le BAW (BuOH/acide acétique/eau, 40:10:50) réagissant positivement au thymol sulfurique (coloration en rouge pourpre caractéristique des sucres). La spectrométrie de masse haute résolution permet d'obtenir la formule brute de ce polyol :  $m/z$  205,0688  $[M+Na]^+$  (masse théorique pour  $C_6H_{14}O_6Na = 205,0687$ ) et nous pouvons ainsi confirmer selon les données de la littérature (Huneck and Yoshimura 1996) la présence de **D-mannitol**.

Le composé **Smo10** (5 mg) a été obtenu sous forme de poudre jaune pâle. Sa formule moléculaire a été attribuée comme étant  $C_{23}H_{22}O_{10}$  sur la base du spectre de masse HR-ESI-MS (mode négatif)  $m/z$  457,1140  $[M-H]^-$  (masse théorique pour  $C_{23}H_{21}O_{10}$ , 457,1135). Les données spectrales RMN  $^1H$  de **Smo10** (Tableau 16) indiquent la présence de signaux pour deux protons aromatiques ( $\delta$  6,93 et  $\delta$  6,78), un groupe méthoxy ( $\delta$  3,90) et deux groupes méthyle ( $\delta$  2,25 et 2,51). Ceux-ci sont similaires à ceux de l'acide périctictique, sauf que le groupe hydroxyle du noyau lactol (position C-9') a été remplacé par un éther butylique. L'observation des spectres NOESY n'a montré aucune corrélation entre le méthyl-8' avec H-9' ce qui confirme la présence du noyau lactol de manière semblable à celles de l'acide stictique et non de l'acide variolarius (Rana, Sargent et al. 1975). La structure complète a été établie en utilisant des corrélations HMBC (fig. 54) avec les connectivités suivantes: H-5 aromatique ( $\delta$  6,93) avec C-1 ( $\delta$  114,56), C-4 ( $\delta$  160,93), C-7 ( $\delta$  162,84), C-8 ( $\delta$  168,66) et C-9 ( $\delta$  21,71); méthyle aromatique H-9 ( $\delta$  2,51) avec C-1 ( $\delta$  114,56), C-5 ( $\delta$  112,86) et C-6 ( $\delta$  147,13); noyau lactol H-9' ( $\delta$  6,78) avec C-1' ( $\delta$  109,67), C-4' ( $\delta$  150,17), C-5' ( $\delta$  139,94), C-7' ( $\delta$  169,88) et C-10' ( $\delta$  71,64) et un méthyl aromatique H-8' ( $\delta$  2,25) avec C-2' ( $\delta$  153,57), C-3' ( $\delta$  122,23) et C-4' ( $\delta$  150,17). La connexion entre la chaîne latérale butyle et de le noyau lactol par une liaison éther a été confirmée par la corrélation HMBC de H-9' à C-10' et une corrélation NOESY entre H-9' avec H<sub>2</sub>-10'.

Ce composé nous paraît en effet correspondre à un composé nouveau initialement présent dans le lichen. Le groupe *O*-butyl-lactol n'est pas répandu dans la nature et la plupart d'entre eux sont des produits d'artéfact d'isolement (Huneck and Tabacchi 1987; Honda, Pavan et al. 2010). Les solvants utilisés pour l'extraction ayant été préalablement distillés, une contamination potentielle par le *n*-butanol pouvait avoir eu lieu lors des étapes d'évaporation. Pour vérifier si **Smo10** pouvait provenir de la transformation de l'acide périctictique en présence de traces de *n*-butanol, nous avons pris deux échantillons de lichen (1g) auxquels nous avons fait subir une macération à température ambiante, d'abord par l'acétone puis par le méthanol afin de reproduire les conditions d'extraction initialement suivies. Ensuite, pour

l'extrait méthanolique du premier échantillon de lichen, 5% de *n*-butanol ont été ajoutés avant l'étape d'évaporation. Cet extrait a ensuite été partagé en deux fractions pour être évaporées l'une à température ambiante et l'autre à 50 °C. La fraction méthanolique du deuxième échantillon de lichen a été évaporée à température ambiante sans ajout de *n*-butanol. Les trois fractions méthanoliques ont ensuite été déposées sur plaque CCM et comparées. La fraction « sans ajout de *n*-butanol lors de l'évaporation » de même que les deux fractions « avec ajout de *n*-butanol lors de l'évaporation » contenaient le composé **Smo10**. Ainsi la température d'évaporation ne semble pas jouer un rôle dans la formation du composé **Smo10** qui semble présent dès le départ dans le lichen. Ce même protocole a été appliqué à l'acide périctictique et le composé **Smo10** n'a pas été repéré après ajout de *n*-butanol lors de l'étape d'évaporation. Le composé **Smo10** ne semble pas provenir d'une dégradation par le *n*-butanol.

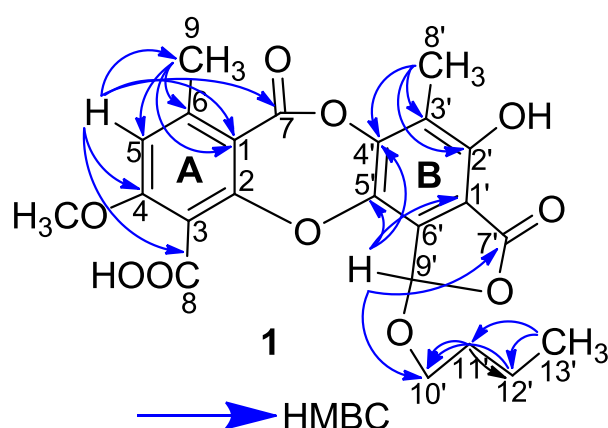


Figure54. Corrélations C-H pour les protons aromatiques de RMN 2D pour Smo10

## 2.4 Discussion concernant les métabolites isolés de *S. montagneanum*

On a isolé cinq composés représentatifs du chemosyndrome de l'acide stictique (Elix and Wardlaw 2000) à partir du  $\beta$ -orcinol. Ces depsidones se différencient selon le degré d'oxydation du substituant en C-8 ( $R_1$  :  $-\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{CHO}$ ,  $\text{COOH}$  ou  $\text{OH}$ ) et de la présence d'un groupe  $\text{OCH}_3$  ou  $\text{OH}$  en  $R_2$ .

L'acide périctictique et l'acide ménégazziaïque ont été isolés pour la première fois du genre *Sterocaulon*, tandis l'acide cryptostictique avait seulement été isolé à partir *Stereaulon azureum* (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992). Il faut noter que ces composés sont en proportion relativement peu abondante dans le lichen mais que les grandes quantités initiales de lichen sur lequel nous avons travaillé ont sans doute facilité cet isolement.

---

### 3 Etude phytochimique des fractions aqueuses de *Stereocaulon montagneanum* Lamb.

Le criblage phytochimique réalisé initialement sur les fractions aqueuses des 9 Stéréocaulons a mis en évidence que des composés de type mycosporines étaient présents dans *S. halei* et *S. montagneanum* (partie 1). Ces composés sont de très bons photoprotecteurs (Balskus and Walsh, 2010) et nous avons mené des travaux phytochimiques sur les fractions aqueuses de ces lichens afin de localiser ces mycosporines au niveau du thalle lichénique mais aussi tenter d'isoler ces composés pour les identifier.

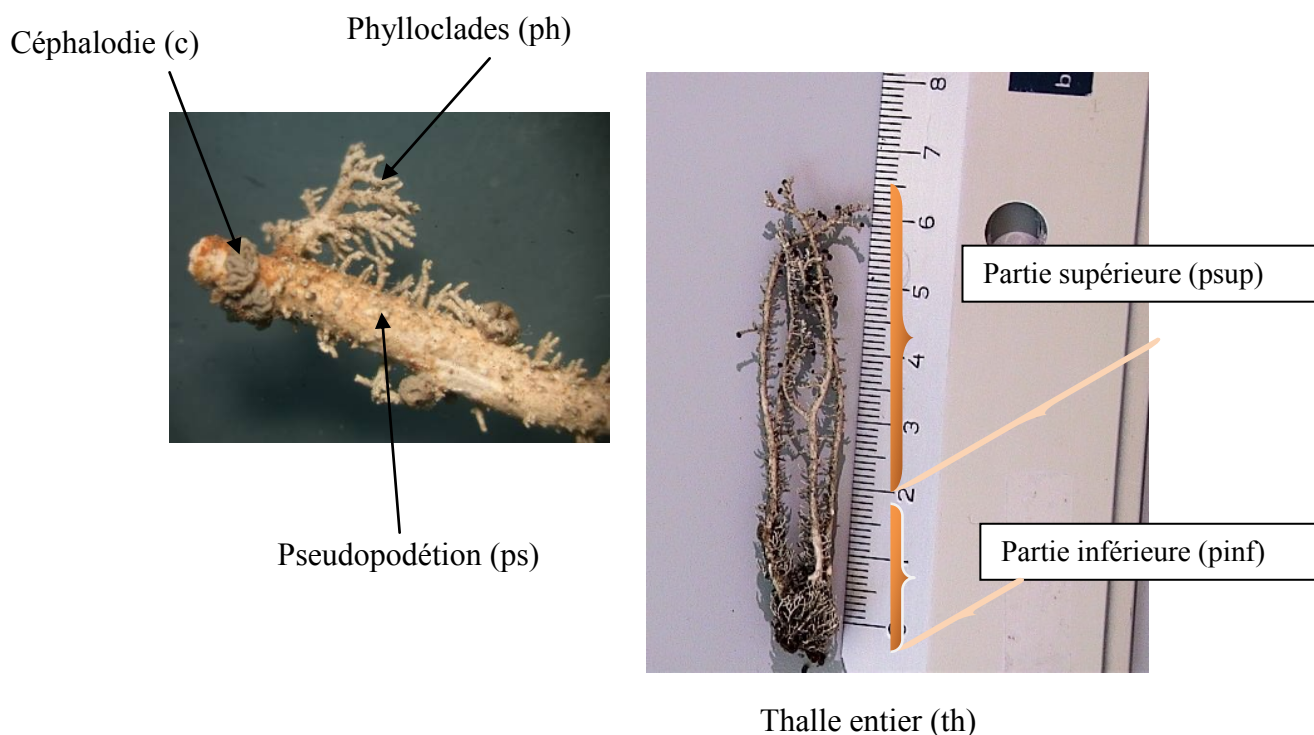
#### 3.1 Recherche de la localisation préférentielle des mycosporines dans le lichen *Stereocaulon*

Le criblage phytochimique ciblé sur les mycosporines avait révélé que certaines espèces comme *S. halei* et *S. montagneanum* en contenaient. Nous avons cherché à localiser ces métabolites azotés au sein du thalle en prélevant et en analysant séparément diverses parties du thalle lichénique.

##### 3.1.1 Préparation des échantillons

Sous la loupe binoculaire, nous avons précautionneusement prélevé à partir de plusieurs exemplaires de lichens, entre 100 et 200 mg de différentes parties anatomiques de chaque espèce (Sh et Smo) à savoir (fig.55):

- Les céphalodies (appelées c)
- Les phylloclades (appelées ph)
- Le pseudopodétions sans aucune phylloclade (appelés ps)
- La partie inférieure du thalle (correspondant au 1/3 inférieur en taille du pseudopodétion) (appelé pinf)
- La partie supérieure du thalle (correspondant au 2/3 supérieur en taille du pseudopodétion) (appelé psup)
- Le thalle entier dans son ensemble (appelé th)



**Figure 55. Visualisation des différentes parties extraites séparément afin de rechercher les mycosporines dans *S. halei* (Sh) et *S. montagneanum* (Sm)**

### 3.1.2 Extraction – Purification

Au total, douze échantillons ont été obtenus (6 localisations par espèce lichénique) et soumis à une extraction aqueuse selon le protocole retenu pour les mycosporines (volume d'eau = 4 mL, temps d'extraction à 4°C = 3H) décrit dans la partie 1. Une purification sur résine échangeuse d'ions (Dowex 50W-X8) dans les mêmes conditions que lors du criblage a permis de comparer les diverses fractions (cf partie expérimentale sec. 3.1.1.1). Quantitativement, on notera des taux d'extraction compris entre 0,2 et 0,6%, exception faite des céphalodies de *S. halei* qui ont un taux d'extraction bien plus élevé : 1,4% (Tableau 17).

**Tableau 17. Taux d'extraction obtenus après extraction aqueuse à partir des différents tissus prélevés**

Code		poids de tissu prélevé (mg)	poids après purification (mg)	taux extraction (%)
1	Sm c	174	0,31	0,2
2	Sm pinf	200	0,43	0,2
3	Sm psup	210	0,62	0,3
4	Sm th	210	1,32	0,6
5	Sm ph	215	0,66	0,3
6	Sm ps	215	0,34	0,2
7	Sh c	100	1,38	1,4
8	Sh pinf	210	0,32	0,2
9	Sh psup	220	0,49	0,2
10	Sh th	200	0,19	0,1
11	Sh ph	223	0,23	0,1
12	Sh ps	220	2,95	1,3

Sm : *Stereocaulon montagneanum* – Sh : *S. halei* – c : *cephalodia* – pinf : partie inférieure – psup : partie supérieure – th : thalle entier – ph : phylloclade – ps : pseudopodetion nu

### 3.1.3 Analyse qualitative des extraits par HPLC-MS

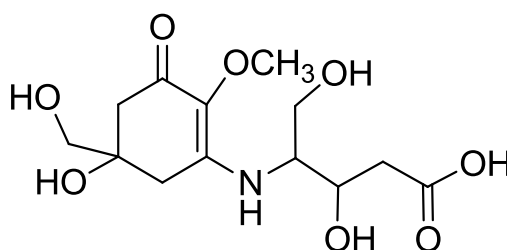
Les échantillons ont été analysés par HPLC/ESIMS/MS dans le laboratoire du Pr R Bauer à Graz, Autriche (cf partie expérimentale sec. 3.4.1). Les extraits aqueux ont été injectés dans un premier temps sur une colonne Phenomenex synergi Hydro-RP (4µm, 150x2 mm) et les produits élués repérés grâce à un détecteur à barrette de diodes. Les signaux correspondant à des profils UV symétriques absorbant aux longueurs d'onde 310 nm (oxomycosporines) et 330 nm (iminomycosporines) ont été plus particulièrement analysés et leurs masses basse résolution ont pu être déterminées. Lorsque les échantillons ont paru renfermer des mycosporines, ils ont ensuite été analysés par HPLC-DAD-MS (colonne Waters Acquity UPLC BEH C-18 column (150 X 2.1 mm, 1.7 lm)) sur un système Waters Acquity UPLC couplé à un détecteur Waters Synapt HDMS q-TOF MS pour permettre la détermination de leurs masses haute résolution et proposer une formule moléculaire.

Le protocole d'élution (phase mobile, temps d'analyse, conditions d'ionisation) a été décrit dans la partie 1. L'ionisation en mode positif a été retenue car elle offrait une meilleure sensibilité.

Des composés de type mycosporine ont été détectés dans les céphalodies et les parties inférieures de *S. halei* et *S. montagneanum*. Elles montrent des longueurs d'onde d'absorption



maximale autour de 330 nm faisant penser à des MAAs avec un noyau de type aminocycloheximine (Tableau 18). Ces échantillons injectés en UPLC–qTOF-MS avec ionisation positive donnent pour les deux espèces une même formule moléculaire correspondant à  $C_{11}H_{19}N_2O_5$ . Une mycosporine avec un  $\lambda_{\max}$  autour de 310 nm a également été détectée dans le thalle entier et la partie inférieure du thalle de *S. montagneanum*. Cela suggère que nous sommes en présence d'une mycosporine possédant un noyau cyclohexenone. La formule moléculaire est  $C_{13}H_{22}NO_7$ . Ces deux mycosporines ont été précédemment caractérisées dans le thalle entier de *S. montagneanum* publié à tort sous l'identité de *S. philippinense*. La mycosporine absorbant à 310 nm est supposée être un isomère de la mycosporine glutamicol (Roullier, Chollet-Krugler et al. 2011)(fig. 56).



**Figure 56.** Structure de la mycosporine glutamicol (Roullier, Chollet-Krugler et al. 2011)

Tableau 18. Composés de type mycosporine repérés par HPLC-DAD–MS and LC–HRMS dans les les échantillons

code		Concentration de l'échantillon (mg/mL)	R <sub>t1</sub> (Polar) min	λ <sub>max</sub> (nm)	m/z [M + H] <sup>+</sup>	R <sub>t2</sub> (Hydro) min	HR-MS	formule moléculaire proposée
1	Sm c	1.24	3.40	335 nm	259	3.30	259.1309	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
2	Sm pinf	1.72	3.48	-	542	-	542.2414	-
				335 nm	259		259.1281	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
				310 nm	304		304.1408	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>7</sub>
3	Sm psup	2.48	-	-	-	-		
4	Sm th	5.28	3.64	310 nm	304	6.40	-	-
			3.09	-	337 (169)			
5	Sm ph	2.64	3.09	330 nm (?)	337 (169)	3.61		
6	Sm ps	1.36	-	-	-	-		
7	Sh c	5.52	2.28	365 nm	-	2.11		
			3.28	335 nm	259	3.44	-	-
8	Sh pinf	1.28	3.29	335 nm	259	3.46	259.1167	-
9	Sh psup	1.96	-	-	-	-		
10	Sh th	0.76	-	-	-	-		
11	Sh ph	0.92	-	-	-	-		
12	Sh ps	11.8	-	-	-	-		

*R<sub>t1</sub> correspond au temps de rétention sur le système HPLC-DAD–IT-MS system; m/z [M+H]<sup>+</sup> sont les masses observées pour chaque pic séparé; MS<sup>n</sup> représente les fragments principaux ; R<sub>t2</sub> correspond au temps de rétention sur le système LC–HRMS; HR-MS correspond aux données haute résolution mesurées et pour chacun d'entre eux, une formule moléculaire est proposée.*

### 3.2 Extraction quantitative et purification à partir de *S. montagneanum*

Afin d'isoler ces mycosporines pour les identifier et mieux comprendre leur métabolisme, nous avons entrepris une extraction ciblée de ces composés en réalisant l'extraction à partir de la partie basale des pseudopodétions de *S. montagneanum*. Ceux-ci ont été triés et individualisés manuellement pour obtenir 500 g de matériel à extraire.

La partie inférieure du lichen séché à l'air (0,5 kg) a été broyée puis a été placée au contact des solvants. L'extraction a été réalisée à froid (4°C) par macération avec de l'eau bidistillée.

Une première extraction liquide-liquide avec du butanol a été réalisée pour réaliser une première purification (fig 57). Seule une petite quantité de composés est extraite par le butanol et l'essentiel de mycosporines reste dans la phase aqueuse sur laquelle nous poursuivons un travail de purification (fig 58).

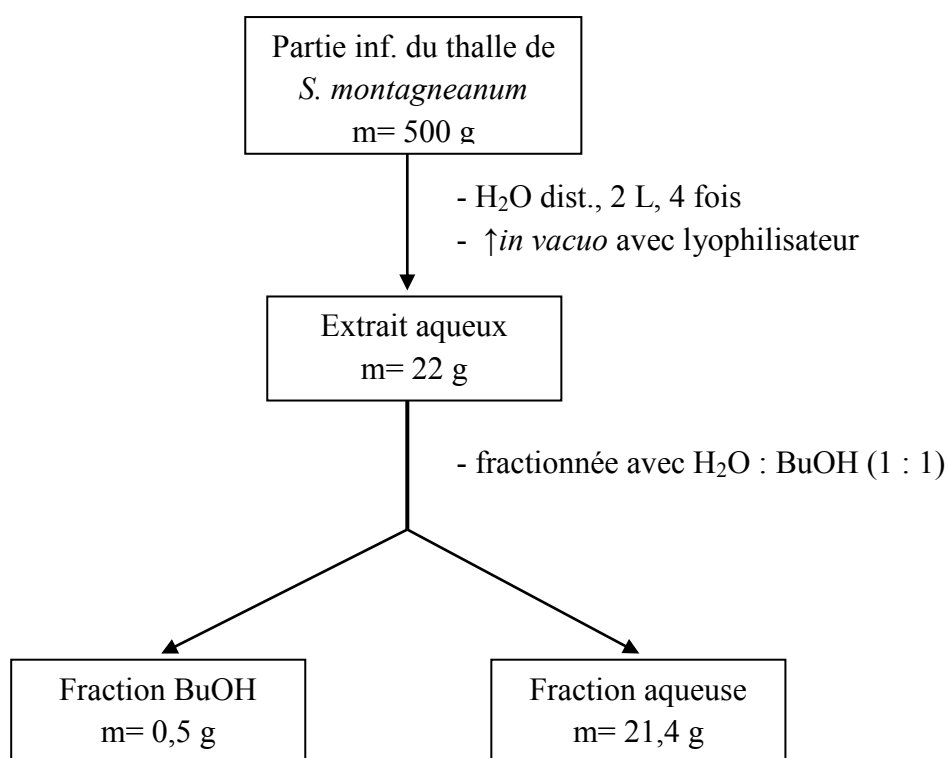


Figure 57. Schéma d'extraction de *S. montagneanum* visant à obtenir des mycosporines

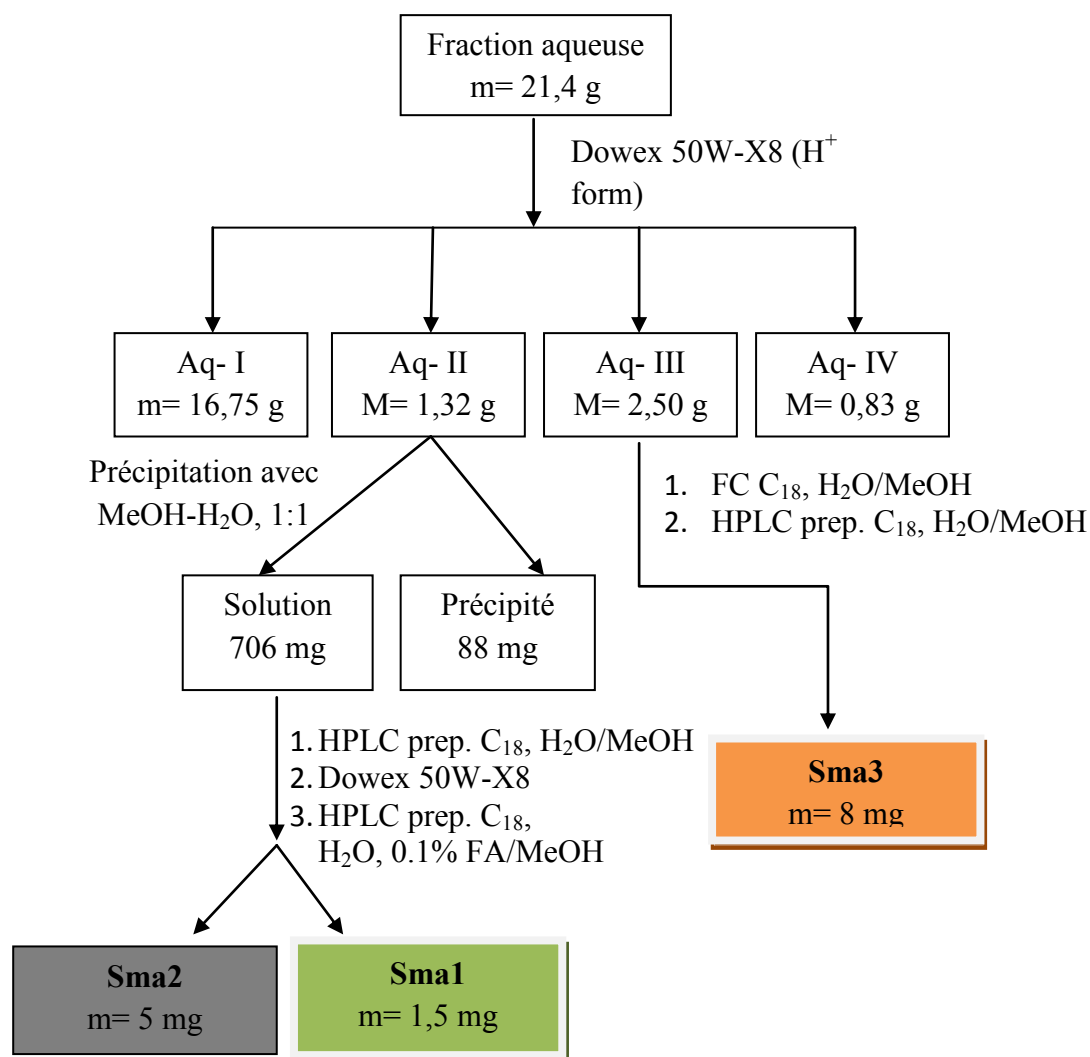


Figure 58 Schéma récapitulatif des purifications et des composés obtenus à partir de la fraction aqueuse de *S. montagneanum* (pinf).

Le passage de la fraction aqueuse sur une résine échangeuse d'anions (Dowex 50W-X8) permet de séparer 4 éluats dont le premier contient l'essentiel des composés précédemment extraits. Les fractions éluées à la suite ont été chromatographiées directement sur colonne C18 pour la fraction Aq-III ou après élimination d'un précipité (obtenu par l'ajout de 50% de MeOH) dans la fraction Aq-II. La succession des approches séparatives indiquées dans la figure29 a abouti à l'obtention de 3 composés (**Sma1** (1,5 mg), **Sma2** (5mg) et **Sma3** (8mg)) pouvant correspondre à des mycosporines

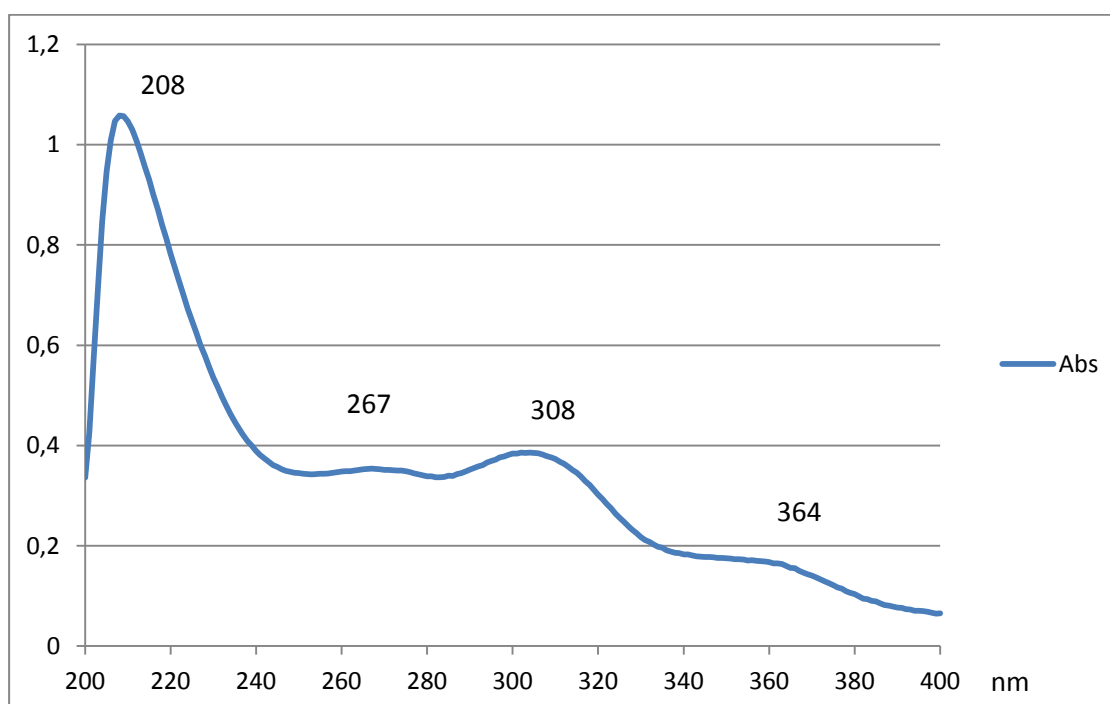
### 3.2.1 Eléments d'identification de *Sma1* et *Sma3*

Afin de s'assurer que nous étions en présence de mycosporines nous avons réalisé un spectre UV compte tenu que ces composés ont un spectre UV très symétrique et centré sur 310 nm ou 330 nm selon qu'il s'agit respectivement d'un squelette de type oxomycosporine ou de type iminomycosporine.

**Sma3** n'ayant pas montré un profil de ce type ( $\lambda = 214$  et  $258\text{nm}$ ) nous n'avons pas étudié ce produit en priorité.

#### **Sma1**

L'enregistrement du spectre UV de **Sma1** fait apparaître 4 maxima à  $\lambda = 208, 267, 308, 364$  nm (figure 59) ce qui suggère que nous ne sommes pas en présence d'une mycosporine pure L'absorbance à 308 nm laisse à penser que nous pouvons avoir une oxomycosporine en mélange avec d'autres composés.



**Figure59. Spectre UV (200-400nm) de *Sma1***

L'injection en HPLC – DAD montre que l'échantillon *Sma1* est constitué de six produits (fig. 60):

- Un produit dont le  $R_t = 5,93$  min ( $\lambda_{\text{max}} = 207, 242, 255$  nm)
- Un produit dont le  $R_t = 7,23$  min ( $\lambda_{\text{max}} = 222, 269, 297, 359$  nm)

- Un produit dont le  $R_t = 8,05$  mn ( $\lambda_{\max} = 307$  nm)
- Un produit dont le  $R_t = 8,61$  mn ( $\lambda_{\max} = 309$  nm)
- Un produit dont le  $R_t = 9,78$  mn ( $\lambda_{\max} = 222, 250$  nm)
- Un produit dont le  $R_t = 16,93$  mn ( $\lambda_{\max} = 333$  nm)

Parmi ces 6 produits, 3 possèdent un profil UV caractéristique des mycosporines : deux d'entre elles possèdent un maximum proche de 310 nm et seraient caractéristiques d'un noyau oxomycosporine et une autre possède un maximum à 330 nm évoquant un noyau cyclohexenimine (figure 60). Un composé ( $R_t = 8,61$  mn,  $\lambda_{\max} = 309$  nm) semble néanmoins majoritaire d'après les analyses LC-MS réalisées en Autriche. Ce composé s'ionise pour donner un ion  $[M+H]^+ = 324,1630$  avec deux fragments importants de  $m/z$  204,12 ( $C_9H_{18}NO_4$ ) et  $m/z$  162,10 ( $C_7H_{16}NO_3$ ), ce qui permet d'établir la formule  $C_{13}H_{26}NO_8$ . Malheureusement, les faibles quantités obtenues pour le mélange (1,5mg) ne permettent pas d'envisager une séparation afin de conduire les analyses permettant d'aboutir à un isolement pour assurer une identification structurale.

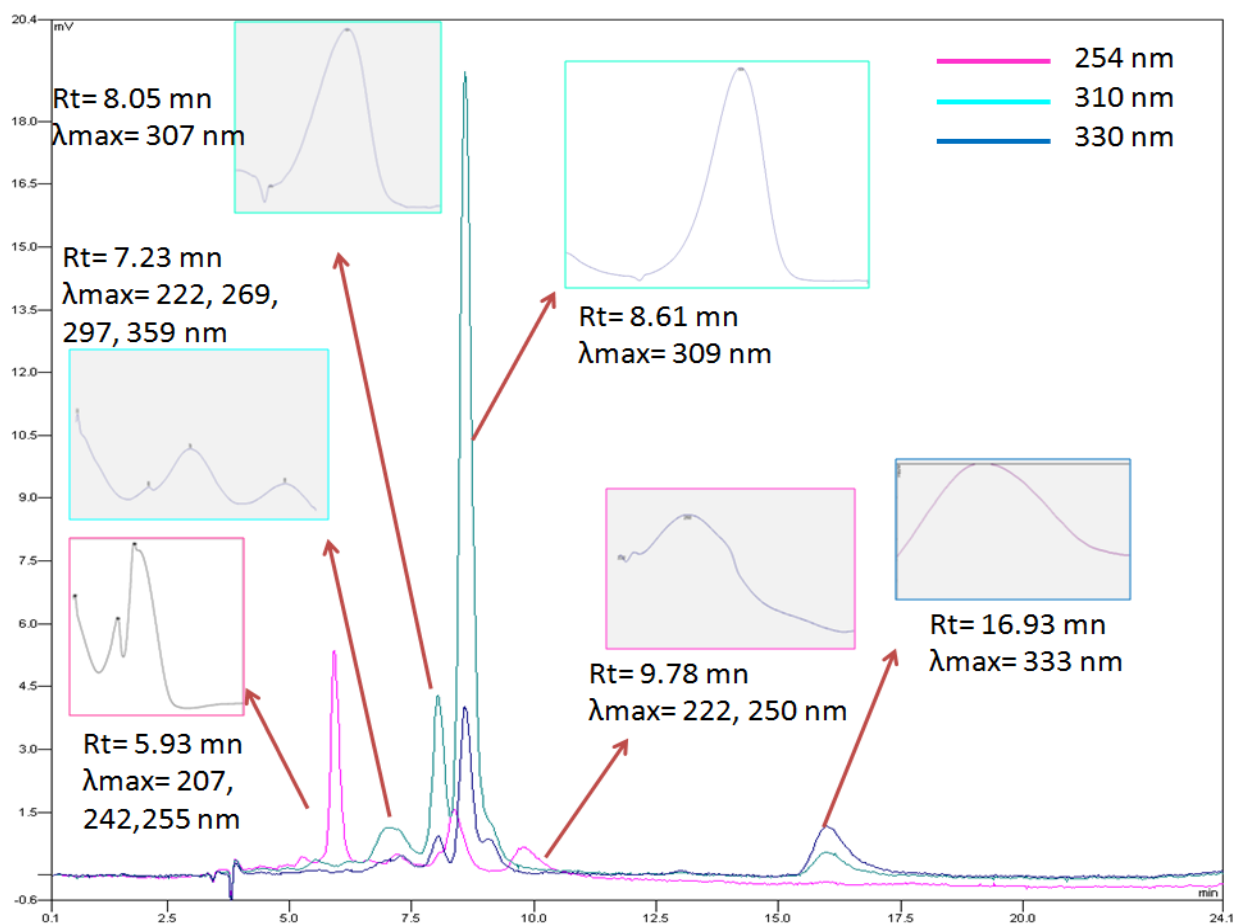


Figure60. Chromatogramme HPLC-DAD et profil UV des composés contenus dans Sma1

### Sma3

Nous avons procédé de façon identique pour analyser la fraction **Sma3** et le profil UV fait apparaître 3 maxima à  $\lambda = 216, 267, 329$  nm (figure 61).

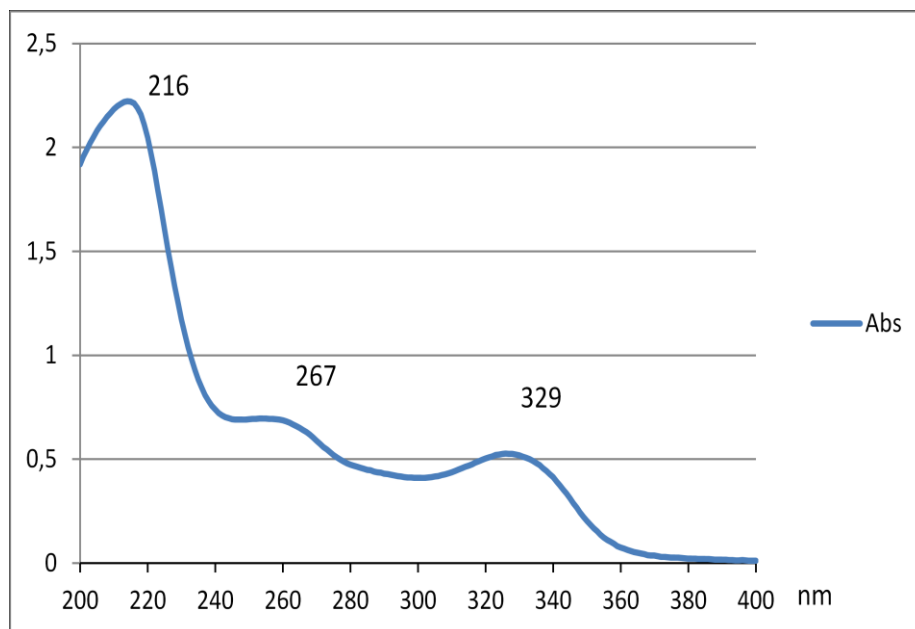


Figure 61. Le spectre UV de Sma3

L'injection en HPLC – DAD (figure 62) montre que la fraction **Sma3** est formé d'au moins 5 produits :

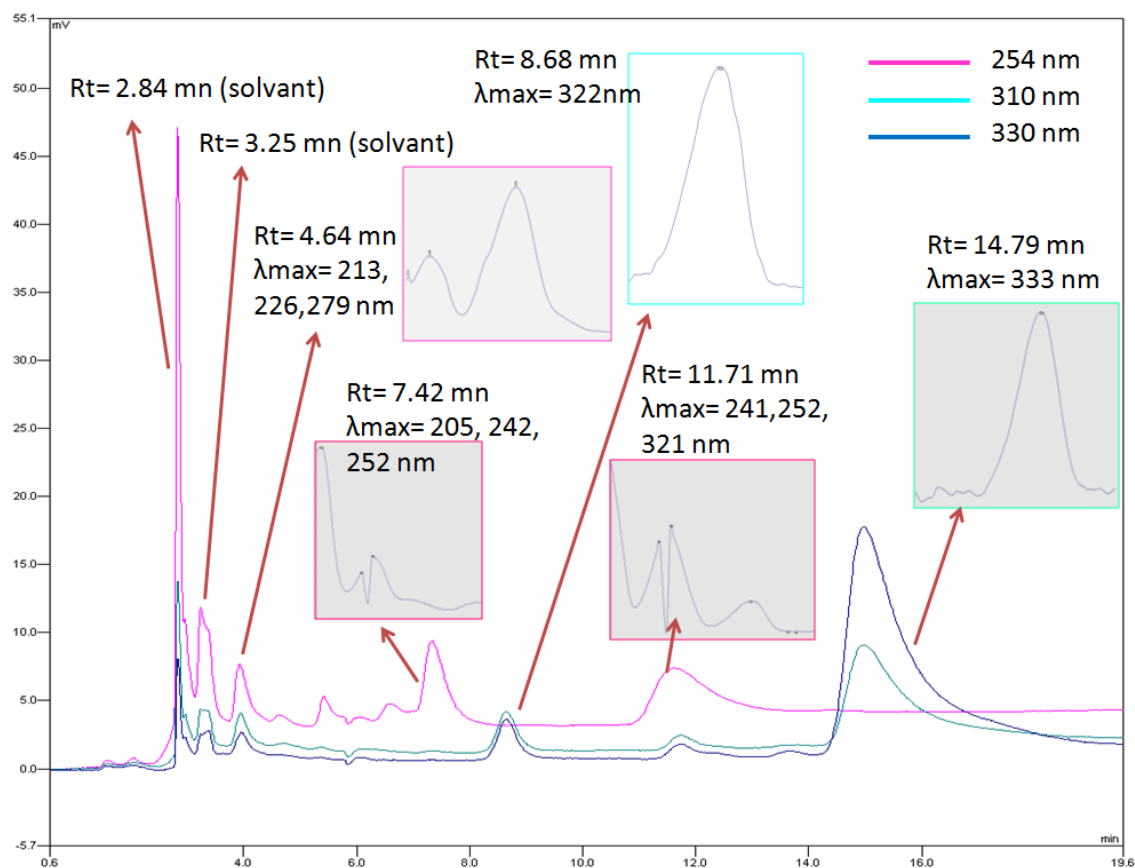
- Un produit dont le  $R_t = 4,64$  min ( $\lambda_{\max} = 213, 226, 279$  nm)
- Un produit dont le  $R_t = 7,42$  min ( $\lambda_{\max} = 205, 242, 252$  nm)
- Un produit dont le  $R_t = 8,68$  min ( $\lambda_{\max} = 322$  nm)
- Un produit dont le  $R_t = 11,71$  min ( $\lambda_{\max} = 241, 252, 321$  nm)
- Un produit dont le  $R_t = 14,79$  min ( $\lambda_{\max} = 333$  nm)

Les signaux apparaissant à 2,84 et 3,25 min sont attribués à des effets de solvant. Parmi les cinq signaux présentant un profil UV, deux composés possèdent un spectre UV symétrique évocateur d'une mycosporine : un composé majoritaire de type cyclohexenimine ( $R_t = 14,79$  min,  $\lambda_{\max} = 333$  nm), et un autre composé se situant à  $R_t = 8,68$  min,  $\lambda_{\max} = 322$  nm..

Le spectre de masse du composé majoritaire ( $R_t = 14,79$  min,  $\lambda_{\max} = 333$  nm) obtenu en HPLC-DAD–MS-MS montre un ion majoritairement présent  $[M+H]^+$  dont  $m/z = 542,2492$ . Cela correspond à la formule brute  $C_{22}H_{40}NO_{14}$ . Les fragments obtenus sont respectivement  $m/z = 366,1748$  ( $C_{15}H_{28}NO_9$ ),  $m/z = 204,1182$  ( $C_9H_{18}NO_4$ ),  $m/z = 348,1644$

( $C_{15}H_{26}NO_8$ ),  $m/z = 186, 1063$  ( $C_9H_{16}NO_3$ ) ce qui correspond à la perte de deux fragments de  $m/z = 162$  suggérant deux hexoses ( $C_6H_{10}O_5$ ).

OOO



**Figure62.** Le chromatogramme de HPLC-DAD de composés Sma3

Il est prévu de continuer à travailler sur cette fraction car son poids de 8 mg peut être suffisant afin de conduire les analyses par RMN et spectrométrie de masse afin de déterminer la structure de cette mycosporine.



### 3.3. Discussion-Conclusion

Ces deux espèces de Stéréocaulon sont des lichens tripartites c'est-à-dire contiennent un mycobionte et deux photobiontes. L'algue verte *Trebouxia* forme la couche algale présente dans les branches phyllocladioïdes et le cyanobionte de type *Scytonema* est localisé dans un endroit limité du thalle, la céphalodie.

Le rôle majeur du cyanobionte est de fixer l'azote atmosphérique grâce à la nitrogénase contenue dans des cellules spéciales appelées hétérocystes. Dans les lichens tripartites, la fréquence des hétérocystes est de 15 – 35 % alors qu'elle n'est que de 4 – 8% chez les lichens bipartites (Rai, Soderback et al. 2000). Cet azote est ensuite transporté vers le mycobionte sous forme d'ammoniac (par transport passif) ou d'ions ammonium (par transport actif) et ce dernier va le transformer grâce à la glutamate deshydrogénase en glutamate (fig.63), clé de voute pour la synthèse entre autres des acides aminés.

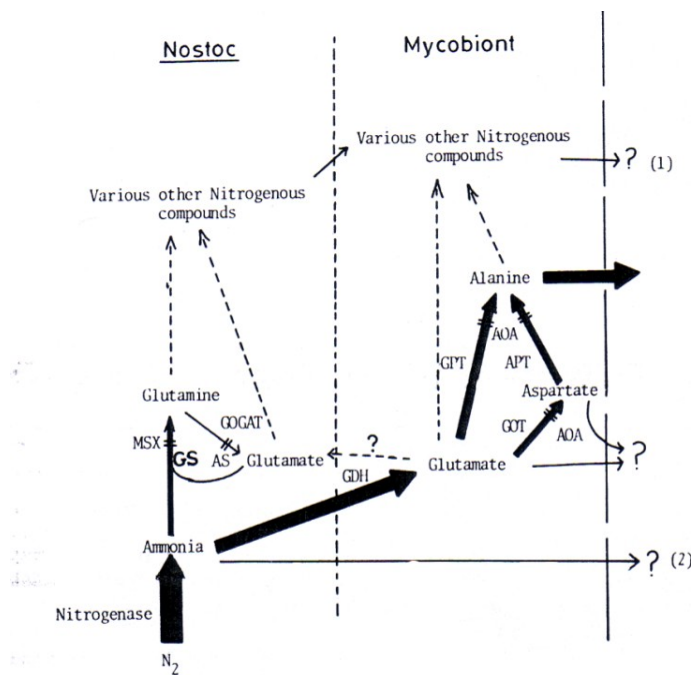


FIGURE 2. Routes of nitrogen metabolism in cephalodia of *Peltigera aphthosa* (based on <sup>15</sup>N kinetics and enzymic studies).<sup>78</sup> Bold arrows = major routes; thin arrows = minor routes; broken arrows = possible minor routes (not studied in detail); ? indicates possible transfer compounds suggested by others.<sup>115,213</sup>

Figure63. Schéma de voies d'échange entre le mycobionte et le cyanobionte chez le lichen tripartite *Peltigera aphthosa* (Rai 1991)

Le cyanobionte tout comme le phycobionte (mais pas le mycobionte) peut également synthétiser du glutamate via les enzymes glutamate deshydrogénase et la GOGAT (glutamine

2-cétoglutarate aminotransférase) mais également de la glutamine via la glutamine synthétase. Cependant, il a été montré dans certains lichens tripartites que les activités de la glutamine synthétase et de la GOGAT étaient réduites mais existantes, afin de favoriser le relargage de l'ammoniac formé, au mycobionte.

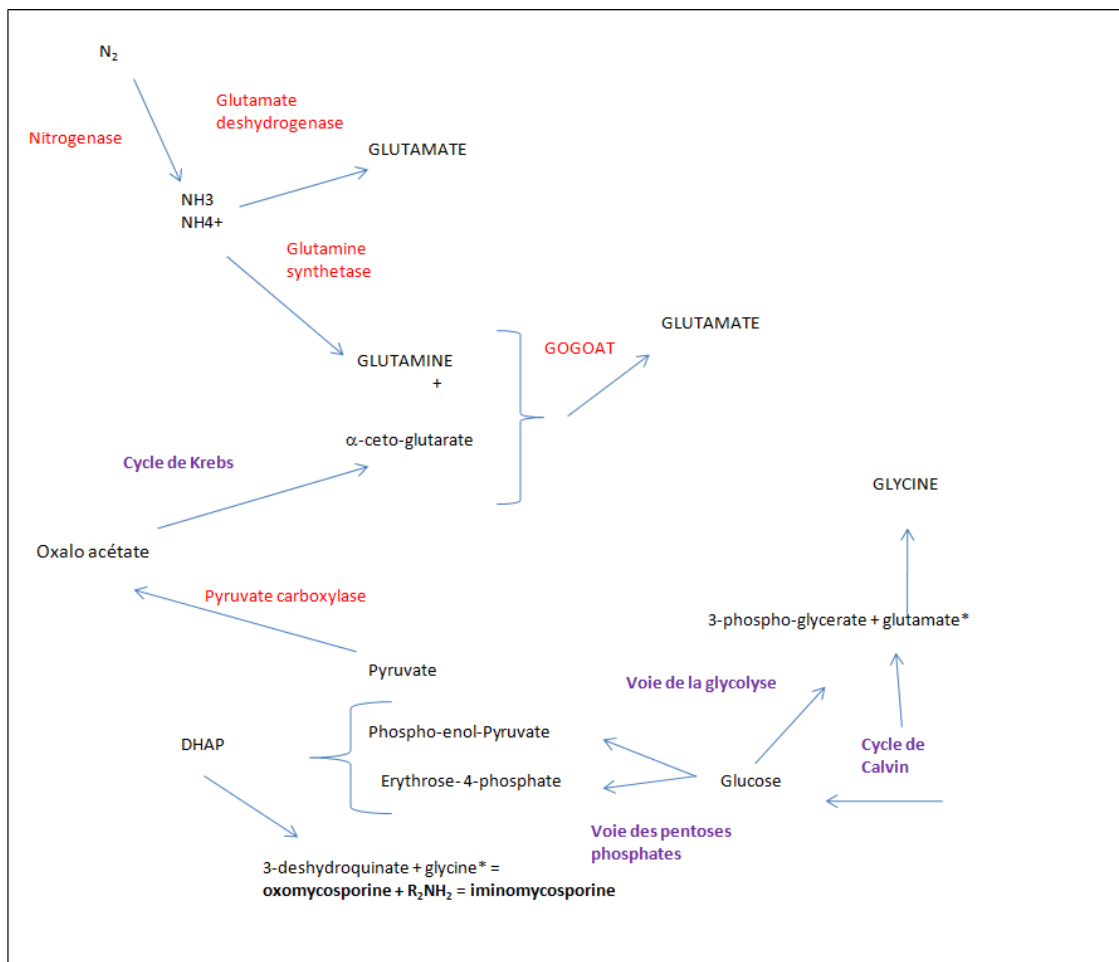


Figure 64. Schéma simplifié des voies métaboliques chez la cyanobactérie

Les cyanobiontes sont également capables de photosynthèse et peuvent fixer le  $\text{CO}_2$  pour synthétiser du glucose via le cycle de Calvin (fig. 64). Dans les lichens bipartites, le cyanobionte transfère tout le glucose à son partenaire fongique mais pour les lichens tripartites comme *S. halei* et *S. montagneanum*, le cyanobionte ne transfère que l'azote et garde le glucose pour ses propres besoins énergétiques ; l'algue verte se chargeant de donner au mycobionte les polyols comme le ribitol et l'arabitol, le champignon les transformant majoritairement en polyols comme le mannitol.

Dans les céphalodies et la partie inférieure du thalle des deux lichens, nous avons retrouvé un type de mycosporine avec un noyau cyclohexenimine qui correspond selon le

schéma de biogénèse de Schick (fig.65) à l'étape ultime de la transamination des oxomycosporines par des acides aminés. Nous avons seulement retrouvé une MAA de type oxomycosporine dans le thalle entier mais pas dans les céphalodies, ni dans les phylloclades.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées :

**Hypothèse 1 :** toutes les mycosporines sont synthétisées dans la céphalodie par le cyanobionte puisque celui-ci possède toute l'ingénierie métabolique pour cette synthèse et les oxomycosporines sont transférées au mycobionte céphalodial. Etant donné la teneur en azote importante dans la céphalodie, l'équilibre entre la biogénèse des iminomycosporines et des oxomycosporines est en faveur des premières. Ensuite, lors du transfert vers le mycobionte, l'équilibre est déplacé dans l'autre sens puisque la concentration en ions ammonium est plus faible.

**Hypothèse 2 :** les oxomycosporines sont produites par le mycobionte et/ou le phycobionte (précurseur) et sont transférées ensuite à la céphalodie pour la dernière étape de transamination.

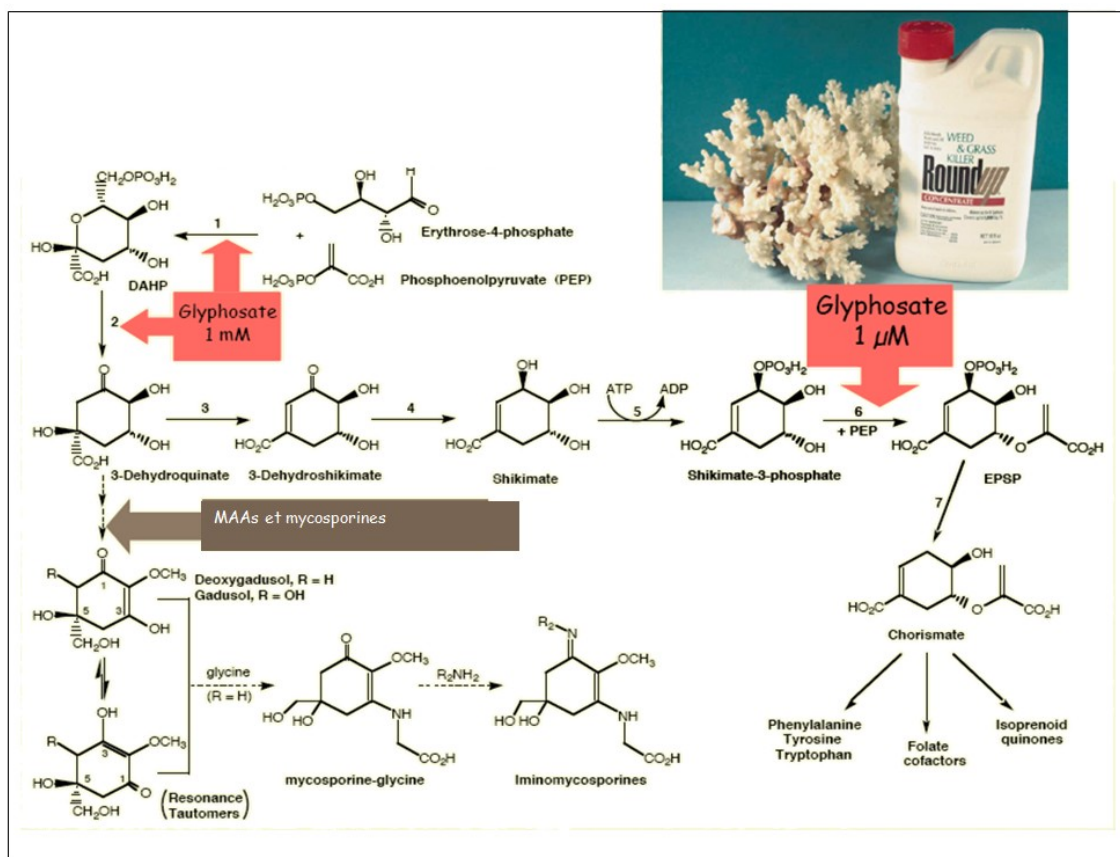
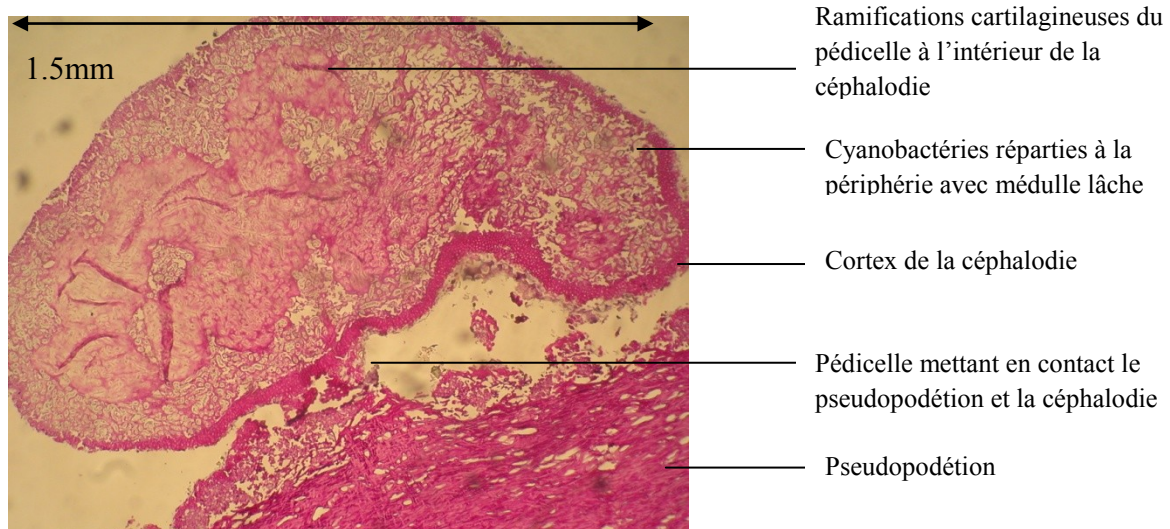


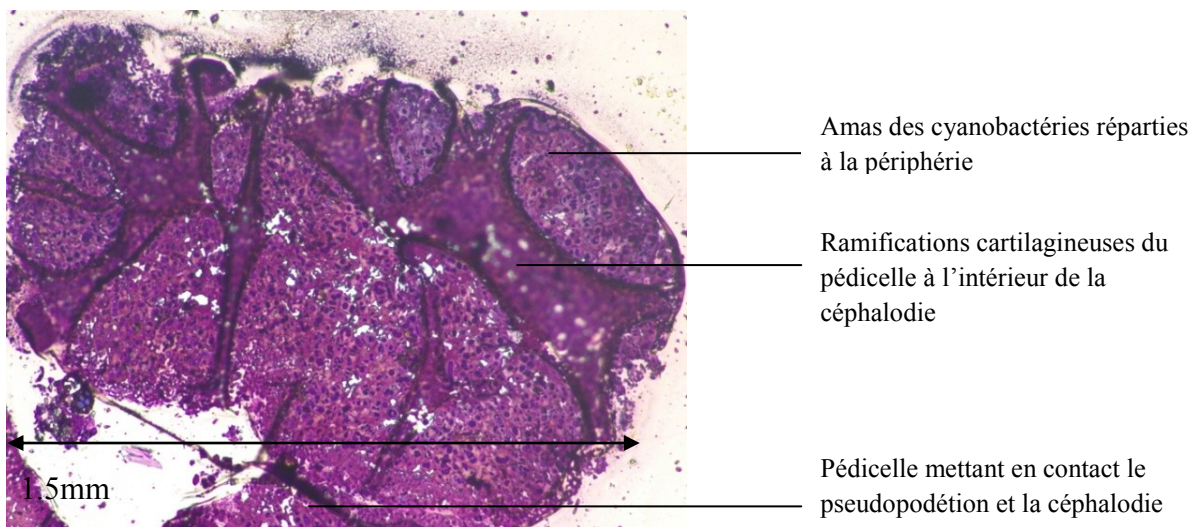
Figure 65. Voie de l'acide shikimique et point de départ de la biogénèse des mycosporines et MAAs (d'après (Shick, Romaine-Lioud et al. 1999))

Dans les lichens tripartites, il existe un contact étroit entre le cyanobionte et le mycobionte (fig 66 et 67) et Rai en 1991 (fig 63) avait déjà évoqué le fait que le cyanobionte pouvait synthétiser « d'autres » composés azotés ; ceux-ci pouvant ensuite être transférés aux

mycobionte céphalodial puis aux parties connexes du pseudopodetion (pinf). Nos observations seraient en accord avec l'hypothèse de Rai et soutiendraient plutôt l'hypothèse 1.



**Figure 66.** Coupe longitudinale de céphalodie de *S. montagneanum* (coloration au HES de la coupe semi-fine)



**Figure 67.** Visualisation des contacts étroits entre les cyanobactéries et les hyphes du champignon formant les ramifications cartilagineuses du pédicelle (coupe transversale de céphalodie de *S. montagneanum* – coloration fuschine des coupes semi-fines)

De plus, plusieurs éléments sont en défaveur de l'hypothèse 2. Il n'a pas été à l'heure actuelle démontré que les champignons pouvaient synthétiser des MAAs (il ne peut synthétiser que des oxomycosporines). Cependant il a été mis en évidence que les

microalgues vertes pouvaient synthétiser des composés photoprotecteurs (Gröniger and Hälder 2002; Karsten, Friedl et al. 2005; Karsten, Karsten et al. 2007; Singh, Rastogi et al. 2008) mais ces composés avaient pour caractéristique physico-chimique principale d'absorber autour de 322 – 324 nm et non à 310 nm comme les composés identifiés. De plus, ces composés n'ont pas été observés dans les phylloclades qui sont les organes où a lieu la photosynthèse et ne suggèrent donc pas une synthèse de la part de l'algue *Trebouxia*.

Chez ces deux espèces de Stéréocaulon, les mêmes MAAs de type iminocyclohexenimine ont été mis en évidence et leurs céphalodies contenaient le même cyanobionte de type *Scytonema*. Le genre *Scytonema* est couramment décrit pour les cyanolichens et les lichens tripartites mais ces cyanobactéries seraient plus proches phylogénétiquement des genres *Nostoc*, *Stigonema*, *Anabaena* et *Hapalosiphon* et le nom *Rhizonema* a été attribué à ce genre scytonematoïde (Lücking, Lawrey et al. 2009). Il est couramment décrit dans la littérature que des cyanobactéries peuvent vivre en épiphytes sur des lichens dont les Stéréocaulons (Duvigneaud 1956) mais la formation d'organes particuliers comme les céphalodies nécessite un grand degré de sélectivité entre le cyanobionte et le mycobionte. Cette sélectivité repose sur un mécanisme de reconnaissance qui permet la « bonne » union et un composé de type lectine isolé de *Stereocaulon vesuvianum* a été impliqué (Leao, Engene et al. 2012). Ainsi, un genre de cyanobactérie indépendamment du champignon pourrait produire des métabolites identiques et pourrait ainsi constituer un marqueur de symbiose. Une étude plus large portant sur d'autres lichens tripartites serait intéressante à poursuivre pour confirmer ces résultats.

Il conviendra aussi de continuer le travail de purification et d'isolement à partir des extraits obtenus suite à l'extraction de 500 g des parties basales de *S. montagneanum*. Seule une analyse spectroscopique des molécules isolées pourra permettre d'assurer l'identification de ces mycosporines dont la purification reste à optimiser.

## **PARTIE 3**

### **Evaluation de l'activité photoprotectrice des métabolites isolés**



## Evaluation de l'activité photoprotectrice des métabolites isolés

Un des objectifs de ce travail est la valorisation des métabolites lichéniques pour leurs propriétés physicochimiques ou biologiques. A partir des 2 Stéréocaulons indonésiens, 8 composés ont été obtenus en quantité suffisante pour réaliser des essais qui, compte-tenu de la spécialisation du laboratoire, ont été menés en priorité sur des tests à visée photoprotectrice, notamment pour des applications dans le domaine cosmétique et thérapeutique.

Ces essais portent sur des tests physicochimiques

- le caractère photoabsorbant de ces composés,
- leur effet sur la mélanogénèse (stimulation ou non de la synthèse de mélanine)

D'autres sur des tests biologiques comme

- l'évaluation de leur cytotoxicité *in vitro* sur cellules de mélanome murines (B16) et de kératinocytes (HaCaT)
- l'effet sur la stimulation de la mélanogénèse (accumulation de mélanine dans des cellules B16)

Avant de présenter les résultats obtenus, nous avons fait un rappel du contexte qui nous amène à utiliser ces méthodes d'évaluation. Nous rappelons donc en préambule le principe de ces tests et les critères à retenir pour apprécier la valeur des résultats.

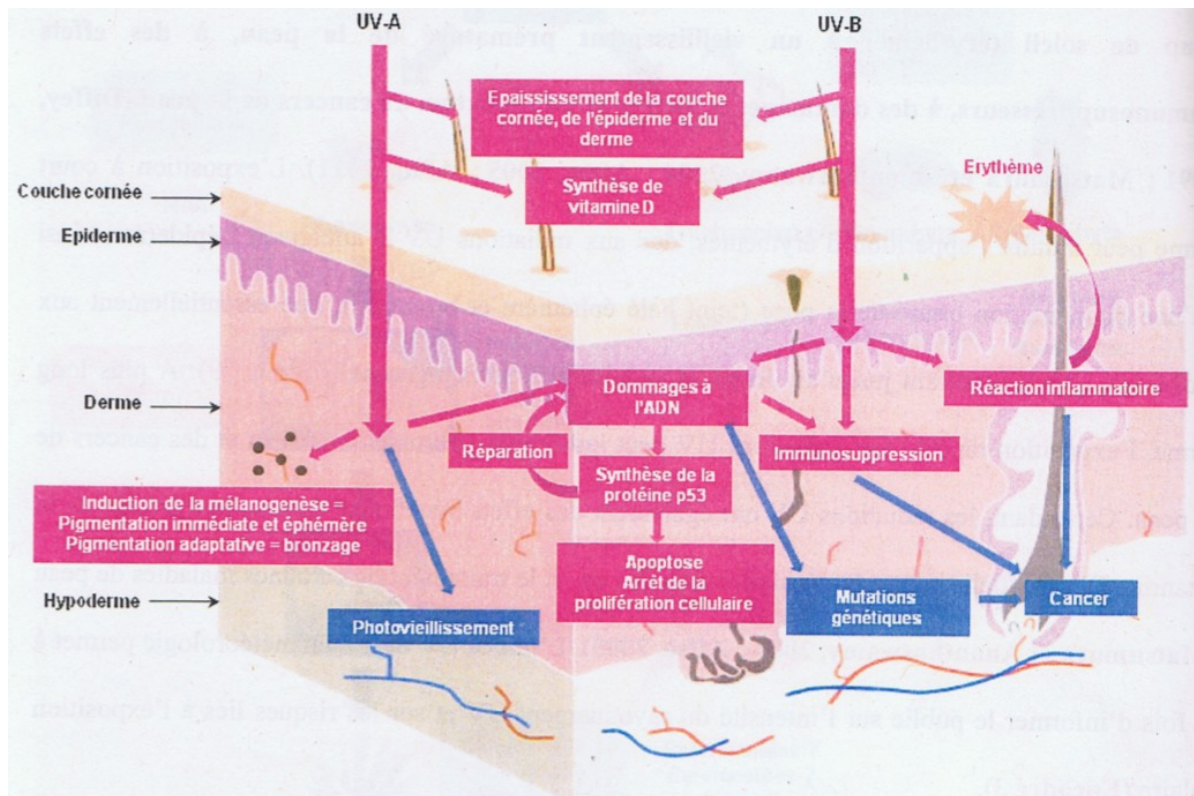
La peau humaine est soumise à de nombreux facteurs environnementaux dont les UV qui occasionnent des dommages à l'ADN et nécessitent des mécanismes de protection pour réduire voire supprimer ou réparer ces dommages. Ces mécanismes incluent l'épaisseur de la peau, les mécanismes de réparation de l'ADN, l'apoptose, l'intervention des enzymes qui détoxifient l'organisme des radicaux libres et la pigmentation de la peau. Dans certains cas, ces mécanismes peuvent être insuffisants car dépassés et une aide complémentaire peut être envisagée. La photoprotection externe désigne tous les moyens visant à protéger la peau contre les effets néfastes du rayonnement solaire. Ainsi, la recherche de composés à visée photoprotectrice inclut-elle la recherche de nouveaux filtres solaires, d'antioxydants mais aussi de composés pouvant stimuler la synthèse d'eumélanine puisque ce composé est un filtre naturel possédant aussi des activités antioxydantes, efficace contre les radiations néfastes (Brenner and Hearing 2008).



---

## 1 Evaluation comme filtre organique solaire

L'exposition solaire est le principal facteur impliqué dans la survenue des cancers cutanés, ce qui a conduit le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) en 1992 à classer le rayonnement solaire parmi les « cancérogènes pour l'Homme » (groupe 1). Les rayonnements UVA (315-400nm), UVB (280-315nm) et UVC (< 280nm), pris séparément, ont été classés parmi le groupe des « cancérogènes possibles » (groupe 2A). Il est maintenant admis que les UVA et les UVB sont tous deux responsables de l'apparition des cancers de la peau, les pics carcinogènes sont à 293 et 380 nm pour les carcinomes épithéliaux, et à 302 et 365 nm pour les mélanomes (El Ghissassi, Baan et al. 2009). Le rayonnement solaire entraîne via les UVB des lésions de l'ADN aux sites dipyrimidiques, ces lésions peuvent entraîner des mutations génétiques si elles ne sont pas convenablement réparées au cours du processus d'excision / re-synthèse. Lorsque les lésions touchent des gènes clés du fonctionnement cellulaire ou des gènes suppresseurs de tumeurs, elles peuvent entraîner une transformation en cellules tumorales. Le rayonnement UVA participe également à la photo-carcinogénèse par la formation d'un stress oxydatif qui libère des espèces oxygénées hautement réactives et potentiellement mutagènes. Parmi les UV, ce sont donc les UVA longs (360-400nm) qui sont les plus impliqués. Les UVA semblent moins mutagènes que les UVB mais étant donné qu'ils arrivent plus nombreux à la surface de la terre, leur importance est quasi-identique. C'est pourquoi la photo-protection de nos jours doit désormais cibler non seulement les UVB mais aussi les UVA (fig. 68). L'exposition aux UV entraîne également l'apparition de « sunburn cells » ou kératinocytes apoptotiques. L'ensemble de ces éléments et quelques autres sont visualisés dans la figure 68.



**Figure68.** Schéma de pénétration des radiations UVA et UVB dans la peau et principaux effets. En rose: effets à court terme; en bleu: effets à long terme (Hupel 2011).

### 1.1 Les caractéristiques d'un bon écran solaire

Un photoprotecteur externe idéal est un composé possédant un large spectre d'absorption (dans les UVA et les UVB), photostable, d'action prolongée, ayant une bonne tolérance dermique et non coloré.

Quelques caractéristiques spectroscopiques peuvent donner des informations prédictives comme :

- un coefficient d'extinction molaire élevé ( $\epsilon > 10000$ )
- des valeurs de ratio UVA/UVB (aires sous la courbe entre 320 et 400 nm). Les filtres sont qualifiés de « larges » si le ratio est compris entre 1.5 et 2, « d'UVB large » si le ratio est compris entre 1 et 1.5 et « d'UVB strict » si le ratio est inférieur à 0.5.
- la détermination de la longueur d'onde critique ( $\lambda_c$ ). Elle est définie comme la longueur d'onde en nm pour laquelle l'aire sous la courbe de DO intégrée de 290 nm à  $\lambda_c$  est égale à 90% de l'aire intégrée de 290 à 400 nm. Un bon UVA doit avoir une  $\lambda_c > 370$  nm.

## 1.2 Détermination des constantes caractéristiques d'un écran solaire

Une méthode a été mise au point au laboratoire afin d'estimer le SPF (Sun Protection Factor) et l'UVA-PF sur une petite quantité de produits (Lohézic-Le Dévéhat, Legouin et al. 2010) car les nombreuses méthodes disponibles sont très consommatrices de produits (Choquenot, Couteau et al. 2008). Cette méthode permet de calculer à partir du spectre UV d'un produit dissous dans une émulsion H/E puis diluée dans l'éthanol :

- les valeurs du SPF (ou UV PF) (appelés SPF-e et UV PF-e)
- l'UVA-PF ou IP UVA (facteur *in vitro* de la protection UVA) (appelés UVA-PFe)
- la longueur d'onde critique ( $\lambda_c$ ) (appelée  $\lambda_{c-e}$ )
- le ratio UVA/UVB (ou UVA PF-e / UV PF-e)

Cette méthode s'appuie sur l'équation mathématique de Mansur (Mansur, Breder et al. 1986) dont certaines valeurs de constantes ont été expérimentalement rapportées par Diffey (Diffey and Robson 1989). Les formules de conversion sont préalablement enregistrées dans une feuille de calcul Excel et lors de la réalisation d'un spectre UV (fig. 69), les valeurs obtenues sont converties par le tableur (cf partie expérimentale). Seuls les composés en grande quantité (supérieure à 5 mg) ont fait l'objet de cette détermination. Deux filtres solaires ont été pris comme référence : l'homosalate (un filtre UVB strict) et l'avobenzone (un filtre UVA) (Tableau 19). Les produits ont été incorporés à la teneur maximale autorisée pour les filtres c'est-à-dire à 10 % (cf partie expérimentale sec. 6.1.2.2).

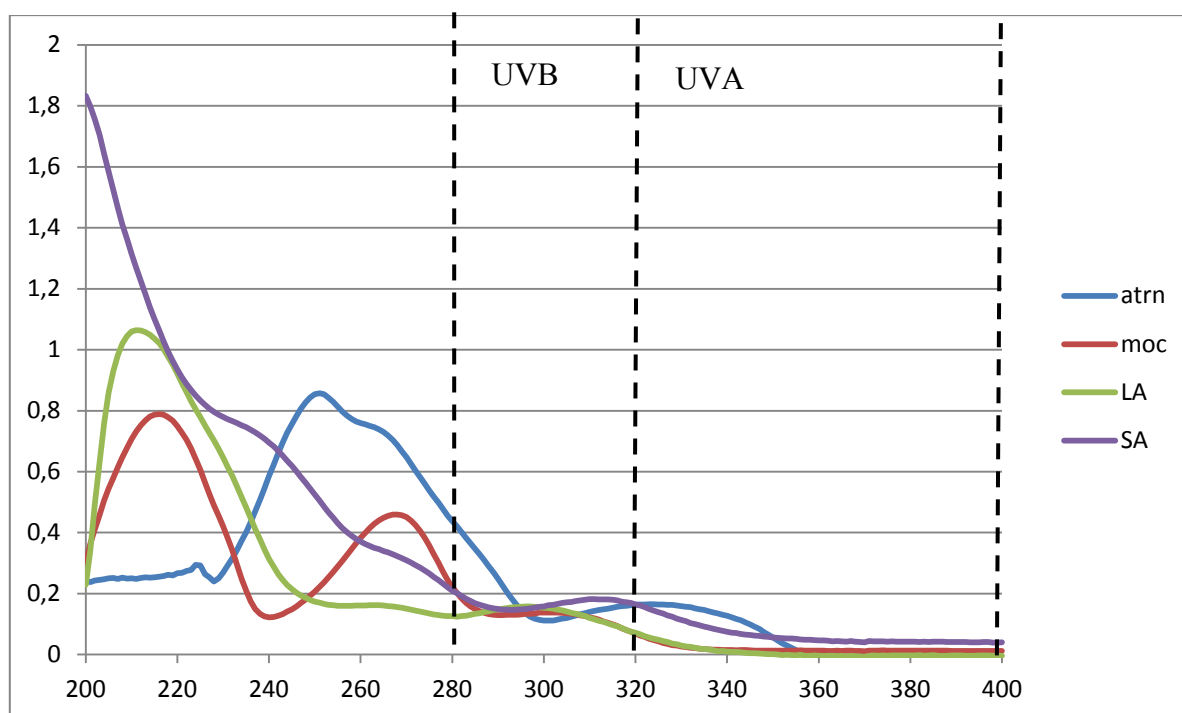


Figure69. Spectres UV de l'atranorine (atr), du MOC (moc), de l'acide stictique (SA) et de l'acide lobarique (LA) qui ont servi au calcul des constantes caractéristiques d'un écran solaire

Tableau 19. Valeurs des  $\epsilon$ , SPF estimé, UVA-PF estimé, ratio UVA/UVB estimé et  $\lambda_{c-e}$  estimé pour l'atranorine, le MOC, l'acide stictique, l'acide lobarique et l'acide lobariol carboxylique comparés à 2 filtres UV de référence (Homosalate et Avobenzène).

	$\epsilon$	SPF-e	UVA-FP-e	SPF-e / UVA-PF-e	$\lambda_{c-e}$ (nm)
Atranorine	5 700 (293), 10 200 (280)	1.21±0.08	1.30±0.05	1	355
Orcinol carboxylate de méthyle (MOC)	3 500 (303)	2.55±0.08	1.05±0.03	1.9	327
Acide stictique	12589 (270) 5888 (313)	1.44±0.05	1.13±0.02	1.1	331
Acide lobarique	9120 (260) 6025 (295)	1.31±0.04	1.08±0.01	1.1	329
Acide lobariol carboxylique	5495 (213) 2570 (252) 1288 (295)	1.44±0.02	1.05±0.01	1.3	324
Homosalate (ref. UV B)	4 600 (306)	4.5	1.32	3.4	325
Avobenzène (ref. UVA)	15 500 (358)	2.3	3.8	0.6	380

Le depside atranorine et les depsidones acide stictique et acide lobarique sont de faibles protecteur contre les UVA et UVB.

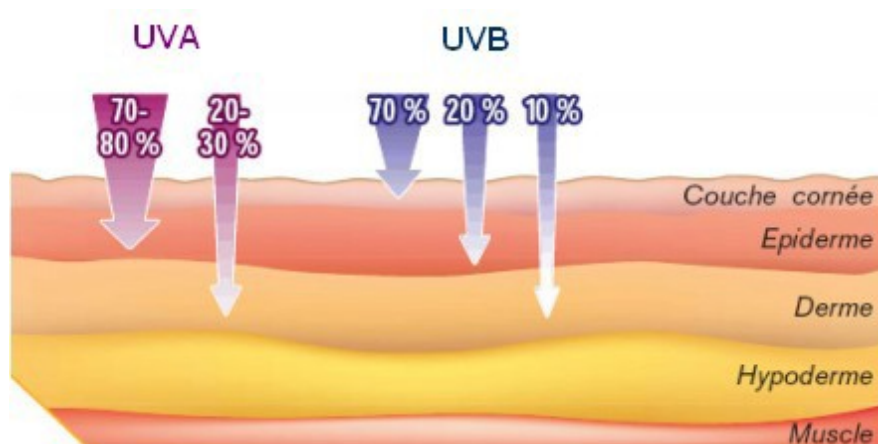
Un composé se distingue des autres par un rapport SPF/FP-UVA # 2 et un SPF-e supérieur à 2 : le composé monoaromatique MOC, qui absorbe préférentiellement dans la zone des UVB. Cependant, ce composé ne possède pas un coefficient d'extinction maximum supérieur à 10 000 mais il est à noter que l'homosalate qui est un composé de référence ne possède pas lui non plus cette caractéristique.

Deux publications rapportent le SPF de l'atranorine et celui de l'acide lobarique. Hidalgo et coll. (Hidalgo, Bascunan et al. 2005) en utilisant une méthode de détermination *in vitro* considèrent eux aussi que l'acide lobarique est un photoprotecteur peu prometteur. En revanche, l'atranorine qui a révélé lors d'études *in vitro* et *in vivo* avoir un SPF supérieur à celui de l'homosalate (SPF > 6) se trouve avec un potentiel sous-estimé par nos résultats ( $\Delta\text{SPF} = 4$ ) (Hidalgo, Bascunan et al. 2005).

---

## 2 Evaluation de l'activité antioxydante

Les radiations UV ne pénètrent pas toutes de la même façon dans les différentes couches de la peau. Plus les longueurs d'onde sont longues, plus elles pénètrent profondément. 70% des UVB sont arrêtés par la couche cornée et 10% sont arrêtés par le derme (fig.70). Les rayonnements visibles et les IR pénètrent jusqu'à l'hypoderme. Ces UV peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO).



**Figure70. Pénétration des radiations lumineuses dans la peau (Syndicat National des Dermato-Vénéréologues)**

La production des EROs conduit à un stress oxydant et semble être un élément déterminant de l'héliodermie puisqu'elles induisent une peroxydation lipidique et des dommages à l'ADN. Il est donc intéressant de tester nos molécules sur des modèles d'activité antioxydante.

## *2.1 Les tests disponibles*

Au laboratoire, deux tests automatisés en plaques 96 puits ont été mis au point pour évaluer l'activité antioxydante des composés isolés. Il s'agit du test au DPPH et du test spécifique du piégeage de l'anion superoxyde (test NBT) (cf partie expérimentale sec. 6.2).

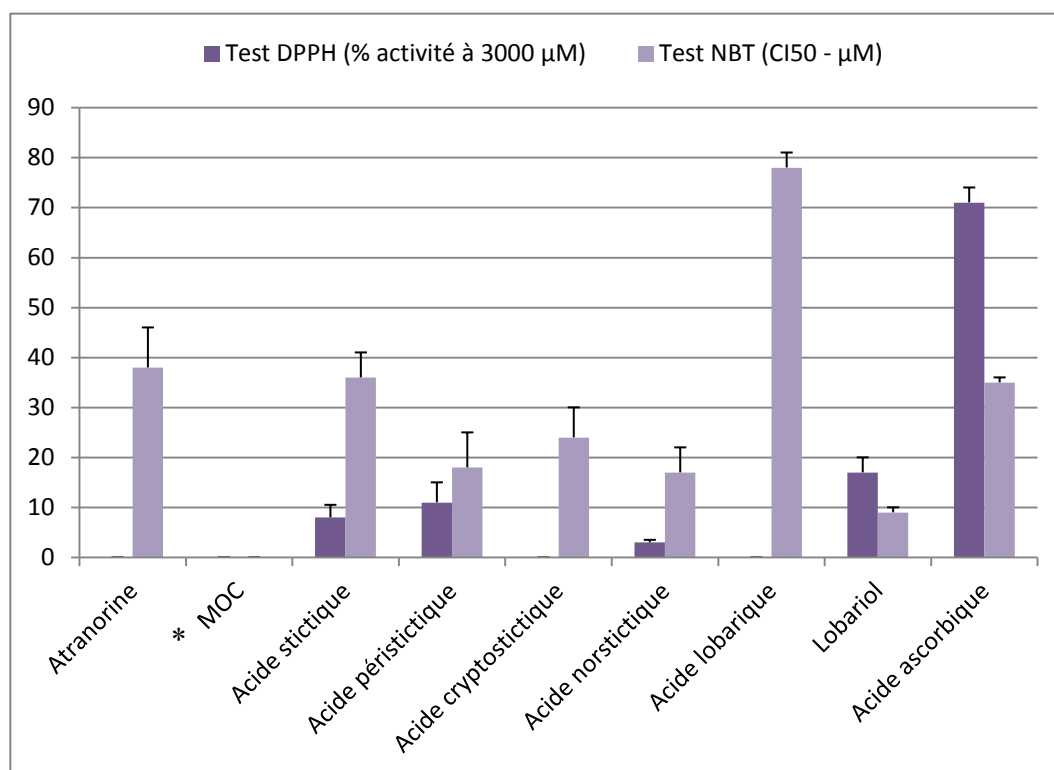
Ces deux tests sont des tests colorimétriques. Le DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl) est un radical stable de couleur violette en solution. Lorsqu'il est réduit en présence d'une substance réductrice (par un mécanisme combinant le transfert d'un atome d'hydrogène et le transfert d'électrons), la couleur de la solution devient jaune. Plus la substance est antioxydante et plus la coloration violette initiale va disparaître. On apprécie ce changement de couleur grâce à un enregistrement à 540 nm (à l'aide d'un spectrophotomètre).

Le test appréciant le piégeage de l'anion superoxyde est également une méthode colorimétrique qui s'appuie sur une compétition entre un réducteur (NBT pour Nitro Bleu Tétrazolium) et le composé à tester. La première étape est de produire des anions superoxydes par une méthode non enzymatique (phénazine méthosulfate en présence de NADH et d'oxygène). On introduit également dans le milieu le NBT (de couleur jaune) et la substance à tester à différentes concentrations. Lorsque le NBT est réduit par les anions superoxydes, il se forme des sels de tétrazolium de couleur bleue. Si le composé à tester est plus réducteur que le NBT, cette coloration bleue n'apparaît pas. On objective grâce au spectrophotomètre à 560 nm l'apparition éventuelle de cette coloration bleue. Plus la coloration sera faible, plus le pouvoir anti-oxydant sera important.

## *2.2 Résultats*

Chaque composé disponible en quantité suffisante a été testé à différentes concentrations (cf partie expérimentale sec. 6.2) par ces deux méthodes et leur activité est comparée à celle de la vitamine C. Une courbe effet / dose a été tracée. Pour l'activité sur le DPPH, l'activité a été exprimée à la concentration maximale testée (3 mM) tandis que pour le test de piégeage des anions superoxydes, la concentration qui inhibe de 50% l'activité a été

déterminée graphiquement. Les valeurs obtenues pour 8 des produits isolés sont données en % d'activité pour le test au DPPH et exprimées par la valeur de la  $CI_{50}$  pour le test NBT dans la figure 71 où une comparaison est faite avec un composé de référence, la vitamine C.



**Figure 71. Activité antioxydante des composés lichéniques sur les tests DPPH et NBT.**

*Les composés atranol, haematommate de méthyle, haematommate d'éthyl et acide ménégazziaïque n'ont pas été testés car ils étaient en quantité insuffisante.*

*\*pour le MOC, l'activité n'atteint pas les 50%*

Les composés lichéniques n'ont pas montré d'activité sur le test DPPH comparativement à l'acide ascorbique (71% d'activité à 3 mM) puisque la plus forte activité à cette concentration est de 17% pour l'acide lobariol carboxylique. En revanche, ces composés, à l'exception du MOC inactif et de l'acide lobarique ( $CI_{50} = 78 \mu\text{M}$ ), ont montré une activité égale voire supérieure au composé témoin ( $CI_{50} = 35 \mu\text{M}$ ) lors de l'expérience du piégeage de l'anion superoxyde : acide lobariol carboxylique ( $CI_{50} = 9 \mu\text{M}$ ) > acide norstictique ( $CI_{50} = 17 \mu\text{M}$ ) = acide périctictique ( $CI_{50} = 18 \mu\text{M}$ ) > acide cryptostictique ( $CI_{50} = 24 \mu\text{M}$ ) > acide strictique ( $CI_{50} = 36 \mu\text{M}$ ).

Plusieurs publications rapportent l'activité antioxydante des composés isolés avec des résultats disparates. Les dérivés monoaromatiques phénoliques ont montré peu d'activité aussi bien lors de tests du DPPH que de tests basés sur la peroxydation lipidique (Kumar and

Muller 1999) (Toledo Marante, Garcia Castellano et al. 2003) même si le manque de contrôle positif (Toledo Marante, Garcia Castellano et al. 2003) empêche une réelle comparaison. D'ailleurs, Lopes (Lopes, Coelho et al. 2008) a synthétisé de nombreux dérivés de l'acide orsellinique et des orsellinates (dérivés méthyles, éthyles, *n*-propyles, *n*-butyles, *iso*-propyles, *sec*-butyles, et *tert*-butyles orsellinates) pour établir une relation structure / activité. Il a confirmé que ces composés étaient largement moins actifs que l'acide gallique ( $CI_{50} = 6\mu M$ ) puisque le plus actif était le résorcinol ( $CI_{50} = 1,84\text{ mM}$ ).

En ce qui concerne l'atranorine, ce composé a montré une activité faible avec le test au DPPH (même à 170 mM) (Kumar and Muller 1999; Mollinedo, Vila et al. 2003; Valencia-Islas, Zambrano et al. 2007) ainsi que sur un test proche basé sur le même mécanisme ABTS $\cdot^-$  (Mollinedo, Vila et al. 2003). Ce composé a néanmoins montré une activité dans les phénomènes de prévention de la peroxydation lipidique (Hidalgo, Fernandez et al. 1994; Kumar and Muller 1999; Jayaprakasha and Rao 2000) et une publication récente utilisant une technique sensible (technique TRAP basée sur la chimiluminescence) a montré (par rapport à des composés témoins) une inhibition du radical AAPH $\cdot$  (générateur de radicaux libres) dose dépendante lors d'une cinétique de 60 minutes (Melo, Dos Santos et al. 2011).

Cette faible activité peut-être expliquée par une diminution de la réactivité des composés due à :

- la formation de ponts hydrogène entre les fonctions hydroxyles aromatiques et les fonctions aldéhydiques et carboxyliques,
- la méthylation de fonctions électro-attractives comme celle de la fonction carboxylique
- la position défavorable des hydroxyles aromatiques en *méta* les uns des autres qui empêche la stabilisation des formes quinoniques formées.

Les composés isolés, à l'exception du MOC, ont en revanche montré une activité très intéressante dans le test NBT dirigé contre l'anion superoxyde. Cette activité spécifique envers l'anion superoxyde avait déjà été démontrée (Lohézic - Le Dévéhat, Tomasi et al. 2007; Melo, Dos Santos et al. 2011) ainsi qu'avec d'autres espèces activées de l'oxygène comme le radical hydroxyle pour l'atranorine et l'acide stictique (Kumar and Muller 1999; Behera, Adawadkar et al. 2003). La confirmation d'une activité de type « piègeur de l'anion



superoxyde » est actuellement en cours de confirmation par une autre méthode basée sur la voltammétrie cyclique (René, Abasq et al. 2010).

### 3 Etude de la cytotoxicité des produits isolés

Dans les tests précédents, les produits étaient évalués sans une appréciation de leur effet sur la cellule et plutôt dans le cadre d'une utilisation préventive de la cancérogénèse. Il est également possible de déterminer *in vitro* leur potentiel cytotoxique afin de connaître la dose à laquelle ils peuvent être utilisés sur ce modèle cellulaire et d'anticiper les concentrations à évaluer pour un usage *in vivo*. Eventuellement, cela permet aussi de déterminer s'ils pourraient avoir des effets cytotoxiques sur des cellules cancéreuses, avec une application possible en chimiothérapie, dans le mélanome par exemple, ce cancer de la peau souffrant notamment d'un déficit thérapeutique.

La toxicité des produits est alors testée en plaque multipuits (cf partie expérimentale sec. 6.3.1) durant 3 jours sur 2 lignées de cellules : les cellules B16 (issues d'un mélanome murin) et des kératinocytes humains, les HaCaT. Le rapport des  $CI_{50}$  (HaCaT / B16) permet le calcul de l'index de sélectivité (IS) qui apprécie l'écart d'activité cytotoxique entre les cellules saines (HaCaT) et les cellules cancéreuses B16 (Tableau 20). Le témoin doxorubicine appartenant à la famille des anthracyclines a été utilisé comme substances de référence.

**Tableau 20. Activité cytotoxique (B16 et HaCaT) au bout de 3 jours des produits lichéniques**

Cytotoxicité au bout de 3 jours			
	B16 $CI_{50}$ ( $\mu$ M)	HaCaT $CI_{50}$ ( $\mu$ M)	IS ( $CI_{50}$ HaCaT / $CI_{50}$ B16)
Atranorine	> 100	36±5	0.36
Orcinol carboxylate de méthyle	63±3	65±10	1
Acide stictique	40±6	23±5	0.6
Acide périctictique	> 100	> 100	> 1
Acide cryptostictique	> 100	> 100	> 1
Acide norstictique	> 100	> 100	> 1
Acide lobarique	38±0.1	51±5	1.3
Acide lobariol carboxylique	NT	NT	NT
Doxorubicine	0,1±0.05	0,18±0.1	1,8

L'acide stictique est le composé le plus cytotoxique ( $CI_{50} \approx 20$  et  $40 \mu M$  sur les lignées cellulaires B16 et HaCaT respectivement), le MOC et l'acide lobarique possèdent une faible cytotoxicité sur les deux lignées cellulaires tandis que les autres dérivés de l'acide stictique ne sont pas du tout cytotoxiques. L'atranorine semble être sélectivement toxique sur les kératinocytes HaCaT humains et ne pas être cytotoxique sur les cellules de mélanome murin B16.

Cette toxicité reste néanmoins insuffisante pour envisager l'usage de ces composés comme cytostatiques car le NCI retient comme intéressant des composés possédant une  $CI_{50} < 10 \mu M$  bout de 3 jours (Boik 2001).

---

## 4 Evaluation des composés sur la mélanogénèse

L'épiderme, les cheveux et les poils sont colorés par des pigments, les mélanines, produites par des cellules spécialisées de grande taille : les mélanocytes. Ils sont situés dans la couche la plus profonde de l'épiderme. Ces pigments mélaniques servent à protéger l'épiderme et les couches profondes de la peau des agressions externes, en particulier des rayons ultraviolets. Les mélanines jouent ainsi un rôle photo-protecteur important. Elles se regroupent autour du noyau cellulaire et le protègent. Elles neutralisent les radicaux libres, facteurs de vieillissement cellulaire. Les pigments mélaniques peuvent être classés en deux groupes :

- Les eumélanines. Ce sont les plus foncés (pigment brun et noir) que l'on trouve dans l'épiderme, les cheveux et les poils.
- Les phaéomélanines. Ce sont des pigments brun-rouges ou jaunes que l'on trouve dans les cheveux roux par exemple.

Il est important de noter que les phaéomélanines ne protègent pas du tout des UV. Les eumélanines, quant à elles protègent mieux des rayons ultraviolets du soleil ; plus l'épiderme est foncé, plus la peau est protégée. Ces pigments mélaniques sont fabriqués par une série de réactions biochimiques que l'on appelle mélanogénèse. Elle comprend la synthèse et la répartition de la mélanine dans l'épiderme. La mélanine est synthétisée dans les mélanosomes, organites provenant de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique du mélanocyte. La synthèse de la mélanine se fait à partir d'un acide aminé, la tyrosine, en présence d'une enzyme à cuivre, la tyrosinase. Par hydroxylation, la tyrosine se transforme en

DOPA (dihydroxyphénylalanine), puis la DOPA est oxydée en DOPAQUINONE (cf partie expérimentale sec. 6.3).

#### 4.1 Principe du test pratiqué

L'objectif est d'incuber des cellules cutanées murines (des B<sub>16</sub>-F10) = B16 capables de pigmenter, avec nos composés isolés afin de déterminer au bout de 3 jours de contact (fig. 72) si ces derniers peuvent activer l'enzyme tyrosinase et stimuler la synthèse de mélanine.

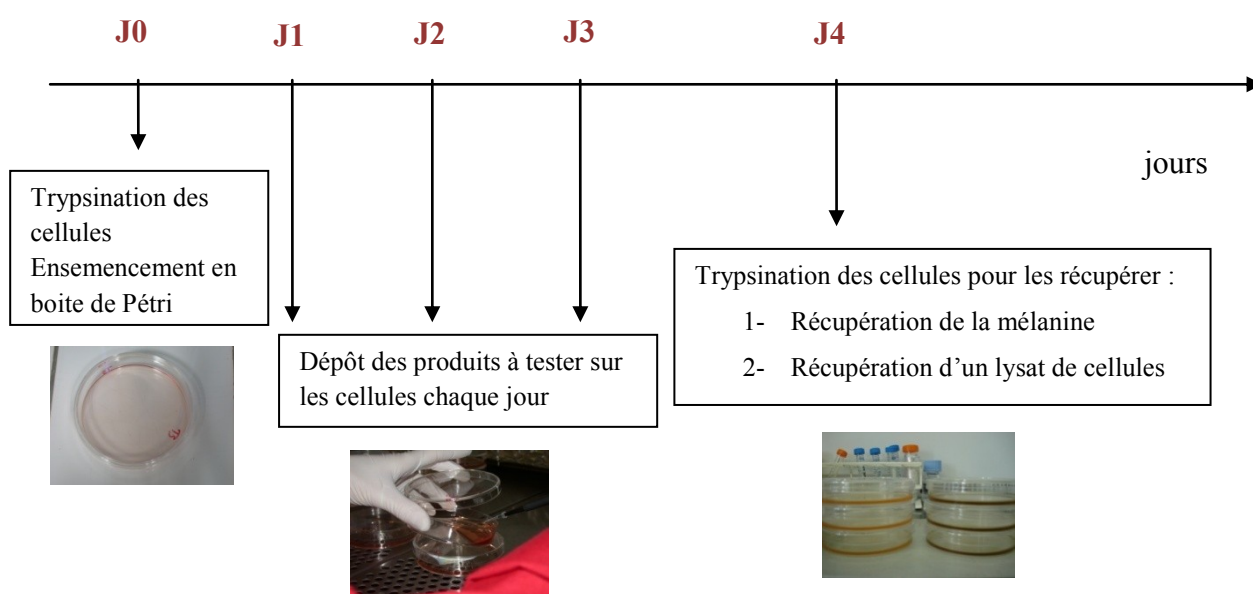


Figure 72. Schéma de représentation synoptique des étapes pour la détermination de la mélanogénèse

Une étape préalable de détermination de la dose maximale non toxique (DMNT) sur les cellules B16 est nécessaire afin de conduire cette expérience sur la mélanogénèse cellulaire en se plaçant à la concentration la plus élevée qui n'interfère pas avec le métabolisme des B16.

#### 4.2 Détermination de la Dose Maximale Non Toxique

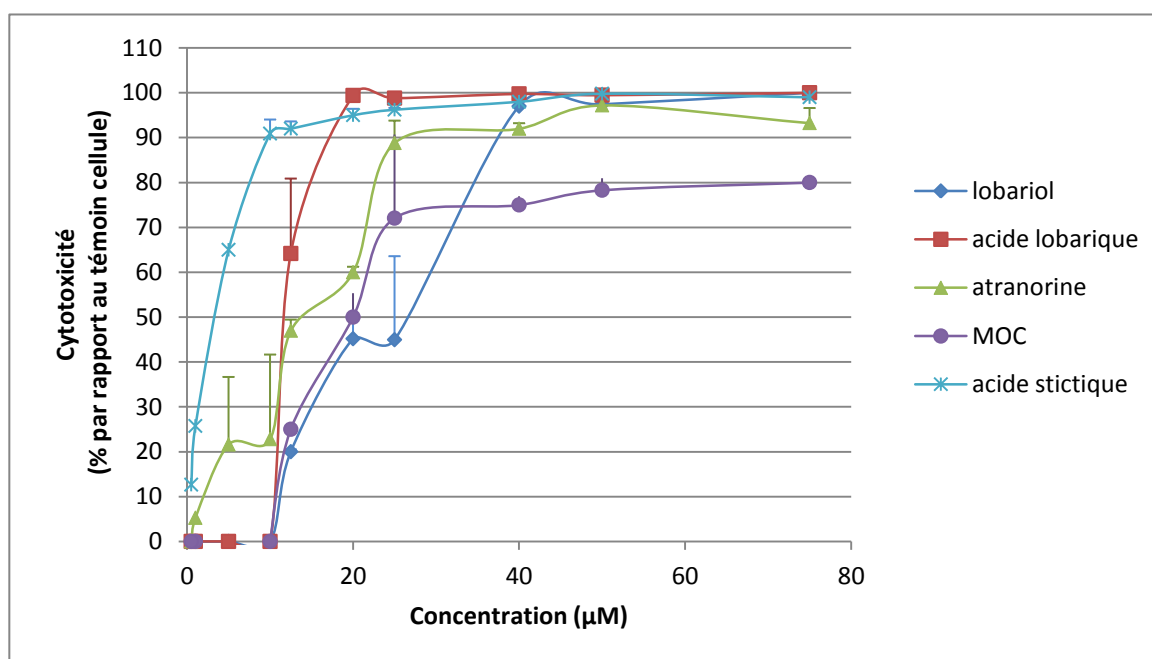
L'évaluation de la cytotoxicité des composés sur les cellules B16 doit être réalisée à nouveau car même s'il s'agit d'une visualisation par le test au MTT, les conditions retenues pour le test sur la mélanogénèse, nécessitent des conditions différentes (plaques 48 puits, incubation de 5 jours, dépôts en triplicat (cf partie expérimentale sec. 6.3.1). Il faut de plus

déterminer la concentration maximale utilisable (DMNT) pour mener à bien les essais sur la mélanogénèse

A partir de la courbe obtenue de la toxicité en fonction des concentrations testées, nous déterminons la concentration toxique à 50% c'est-à-dire la concentration qui tue 50% des cellules dans les conditions de l'expérience ; nous en déduisons également la dose maximale non toxique (DMNT, pas de mort cellulaire = cytotoxicité <80%) à déposer sur les cellules nous mettant ainsi dans des conditions optimales pour que les cellules répondent à la stimulation sans entrainer leur mort.

La vincristine, alcaloïde inhibiteur de la formation du fuseau mitotique et médicament de chimiothérapie issu de la pervenche de Madagascar, a été testée comme substance de référence cytotoxique.

Les courbes de cytotoxicité en fonction de la concentration ont permis de calculer la  $CI_{50}$  et la DMNT de la vincristine ainsi que celles de 5 des produits lichéniques dans ces conditions (fig.73). La courbe obtenue pour la vincristine ( $CI_{50} = 2,10^{-3} \mu M$ ) n'y figure pas car sa toxicité étant très importante, l'échelle des concentrations ne permet pas de la comparer de manière adéquate.



**Figure73.** Courbes exprimant l'activité cytotoxique sur les cellules B16 en fonction d'une concentration croissante des 5 composés lichéniques (test sur 5 jours).

Graphiquement, on s'aperçoit que pour des concentrations supérieures ou égales à 40  $\mu M$ , les composés entraînent une mortalité de toutes les cellules (> 80 %) (fig.73). Pour tous

les composés, la cytotoxicité est plus importante que celle déterminée précédemment sur ces mêmes cellules, essentiellement en lien avec le temps de contact qui est prolongé de 48h. Le cytotoxicités relatives de ces composés restent cependant globalement les mêmes que lors des essais réalisés en plaques multipuits sur 3 jours. L'acide stictique est le plus toxique avec une  $CI_{50} = 3.5 \mu M$  et une DMNT =  $0.1 \mu M$ , elle aussi relativement basse (tableau 21).

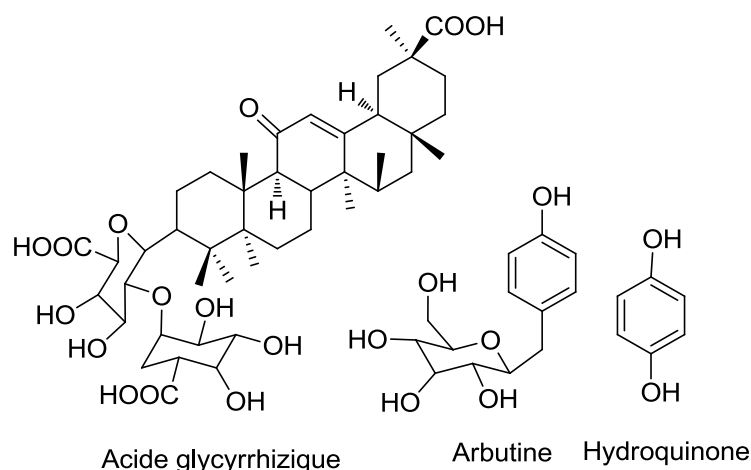
**Tableau 21. Activité cytotoxique des produits lichéniques sur 5 jours (exprimée en  $CI_{50}$  -  $\mu M$ ) et détermination de leur Dose Maximale Non Toxique (en  $\mu M$ ).**

Cytotoxicité au bout de 5 jours		
	B16 $CI_{50}$ ( $\mu M$ )	DMNT ( $\mu M$ )
Atranorine	$11 \pm 4$	0.5
Orcinol carboxylate de méthyle	$19 \pm 4$	10
Acide stictique	$3,5 \pm 1$	0.1
Acide lobarique	$11 \pm 0.5$	10
Acide lobariol carboxylique	$18 \pm 8$	10
Vincristine (témoin positif)	$2,10^{-3} \pm 5,10^{-4}$	-

*Les acides cryptostictique, norstictique et péristictique n'ont pas été testés faute de quantité suffisante.*

### 4.3 Evaluation sur la mélanogénèse

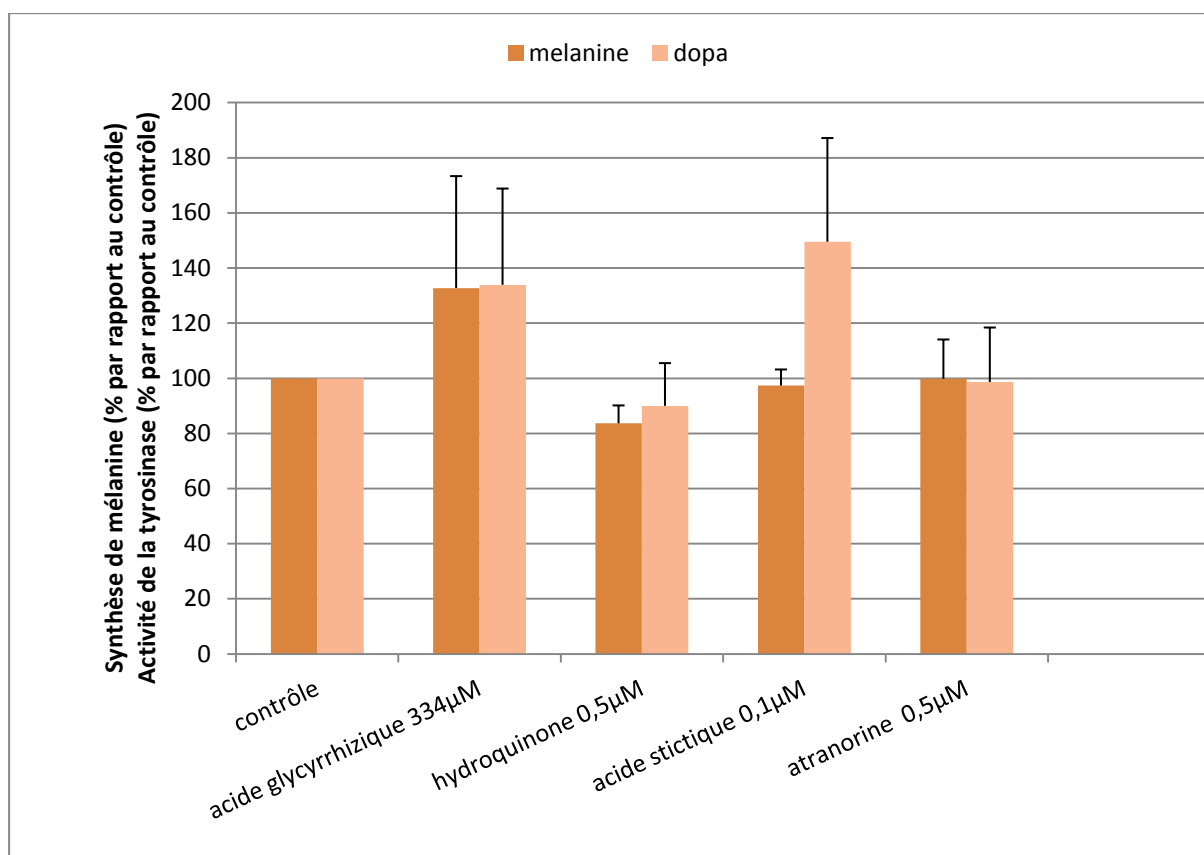
Compte tenu des quantités disponibles et d'essais antérieurs réalisés sur la mélanogénèse pour certains produits comme le MOC, seuls l'acide stictique et l'atranorine ont été incubés durant 5 jours sur cette même lignée de cellules B16 à la DMNT définie précédemment. Deux composés témoins ont été également testés simultanément : l'acide glycyrrhizique (hétéroside triterpénique issu de la réglisse) connu pour être stimulant de la mélanogénèse (Jung, Yang et al. 2001) et l'hydroquinone, composés phénolique, présent sous forme hétérosidique (arbutine) dans des plantes comme la busserole ou les bruyères et connu pour être inhibiteur de la tyrosinase (Hu, Zhou et al. 2009)(fig. 74).



**Figure 74. Structures de l'acide glycyrrhizique (mélano-stimulant), de l'arbutine et de l'hydroquinone (dépigmentants)**

Les cellules B16 sont des mélanocytes qui contiennent de la mélanine. Elles ont la capacité de se pigmenter ou de se dépigmenter par activation ou inhibition de la voie de la mélanogénèse. L'objectif de cette étude est de visualiser un effet stimulant ou inhibiteur de nos produits sur la mélanogénèse puis d'en étudier l'éventuel mécanisme d'action. Deux critères sont objectivés au bout de 5 jours d'incubation : la synthèse de la mélanine et l'activité de l'enzyme tyrosinase. A l'issue, les cellules sont récupérées après trypsination et le lysat cellulaire obtenu est divisé en deux parties. La première partie permet, après action de la soude pour dissoudre la mélanine, de doser celle-ci par une méthode colorimétrique à la longueur d'onde de 405 nm. Sur le deuxième aliquot, de la L-DOPA, substrat de l'enzyme tyrosinase, est ajouté et il se forme alors de la dopaquinone dont la quantité (proportionnelle à l'activité de la tyrosinase) est appréciée par spectrophotométrie à 450 nm.

L'activité est exprimée en pourcentage d'activité par rapport aux cellules témoins n'ayant reçu que le solvant de dissolution (= DMSO <1%) (Fig. 75).



**Figure75. Activités des composés sur la mélanogénèse : impact sur la synthèse de mélanine et l'activité de l'enzyme tyrosinase**

L'acide stictique augmente l'activité de la tyrosinase de façon comparable à celle de l'acide glycyrrhizique) mais cette augmentation est sans effet sur la synthèse de la mélanine. L'atranorine n'a aucune activité sur la voie de la mélanogénèse. Ainsi, aucune activité significative sur la mélanogénèse n'a donc pu être mise en évidence pour les deux composés testés.

---

## 5 Conclusion

Les composés testés n'ont pas montré d'activité notable sur la pigmentation cellulaire et ne possèdent aucune des caractéristiques remarquables en tant que filtres UV. La seule activité pouvant être considérée pour les dérivés de l'acide stictique correspond à leur utilisation possible comme antioxydants, d'autant plus que leur toxicité cellulaire est faible sur deux lignées cellulaires évaluées. Nous n'avons pu évaluer que l'activité de 2 composés sur la mélanogénèse mais cela devrait être étendu à d'autres molécules lichéniques. La tyrosinase appelée également polyphénol oxydase est l'enzyme clé de la mélanogénèse et de par sa nature, c'est une enzyme qui possède une affinité pour les composés phénoliques dont plusieurs sont connus pour être inhibiteurs de cette enzyme (Parvez, Kang et al. 2007). Deux d'études ont été actuellement publiées concernant l'effet de composés lichéniques sur les lichens. Le peroxyde d'ergostérol isolé de culture de lichens (Kinoshita 1997), des extraits méthanoliques de deux lichens *Umbilicaria esculenta* et *Usnea longissima* (Kim and Cho 2007) ainsi que des extraits d'*Hypogymnia physodes*, *Letharia vulpina* et de *Cetraria juniperina* (Higuchi, Miura et al. 1993) ont montré un effet inhibiteur de la tyrosinase et de la synthèse de mélanine. Un brevet a été déposé récemment par notre équipe (Boustie, Galibert-Anne et al. 2011) concernant d'autres types de composé lichénique impliqués dans la stimulation et l'inhibition de la mélanogénèse (Abrahams, Lohézic-Le Dévéhat et al. 2008).





## **Discussion et conclusion**



## Discussion et conclusion

Une des premières difficultés rencontrées au cours de ce travail a porté sur l'identification du matériel lichénique sur lequel nous avons travaillé. Les lichens sont en effet particulièrement variés mais aussi très ressemblants pour certains groupes. C'est le cas des stéréocaulons que nous avons étudié dans le cadre de cette thèse. Sans être un spécialiste de la question, j'ai pris l'opportunité de récoltes facilitées par l'abondance de ces lichens en Indonésie pour apporter une contribution en étudiant plus particulièrement la phytochimie de quelques espèces. Grâce à l'aide de spécialistes et notamment celle du Dr Harrie Sipman, conservateur de l'herbier lichen au museum de Berlin et grand connaisseur des lichens du Sud-Est asiatique, j'ai pu progresser avec le soutien de mes encadrants et les compétences de l'équipe PNSCM pour dépasser ce premier écueil. Mon étude a aussi bénéficié d'un environnement très favorable avec l'accès à la collection lichen des Abbayes qui comprend également une riche documentation scientifique mais aussi du recueil de divers spécimens en provenance de régions variées. L'étude sur les lichens de l'île de la Réunion menée dans le même temps par une étudiante en pharmacie, Nina Corlay a été une opportunité très enrichissante pour les études menées dans la première partie de cette étude. La comparaison de plus d'une dizaine d'espèces de ce genre difficile à identifier était en effet un préalable incontournable. Nous avons tenté de combiner plusieurs approches pour différencier ces espèces en menant une étude botanique, chimique et phylogénétique sur ces espèces. Pour l'étude morphologique, nous avons pris tout particulièrement en compte les travaux de Lamb publiés sur ce genre entre 1965 et 1977 et qui font autorité. Nous avons réalisé plusieurs observations microscopiques avec un approfondissement en MEB pour les deux espèces (*S. halei* et *S. montagneanum*) qui ont été étudiées dans la deuxième partie du travail.

Ces examens morphologiques ont permis de classer en deux grands groupes les neuf espèces de notre collection. Un **premier groupe** (*S. grande*, *S. vesuvianum*, *S. graminosum*, *S. vulcani*, *S. evolutum*, *S. dactylophyllum*) possède un hyménium et un hypothécium  $< 75 \mu\text{m}$ , des spores plutôt  $< 40 \mu\text{m}$ , un nombre de septa  $< 4$ , des céphalodies de type sphérique. Au sein de ce premier groupe, on peut distinguer un **sous-groupe** correspondant à *S. vulcani*, *S. evolutum*, *S. dactylophyllum* dont les phylloclades sont non-granuliformes, non-peltées (plutôt digitées ou coralloïdes) et dont les apothécies sont plus grandes ( $> 0,95\mu\text{m}$ ). Le **deuxième groupe** (*S. halei*, *S. montagneanum*) est caractérisé par des espèces possédant des branches phyllocladioïdes, un hyménium et un hypothécium  $> 75 \mu\text{m}$  et des céphalodies

scrobiculées. Une espèce semble être plus difficile à classer, *S. scutelligerum* car elle possède des caractéristiques intermédiaires.

Cette exception se retrouve aussi au niveau des analyses chimiques menées sur ces espèces où *S. scutelligerum* peut être rapproché du groupe contenant de l'acide stictique bien que ce composé n'apparaisse pas dans son profil de métabolites secondaires, mais un composé proche, l'acide norstictique est visualisable. La caractérisation des principaux métabolites a été réalisée grâce à des analyses comparatives en CCM couplées à un spectrophotodensitomètre et la migration en parallèle de témoins détenus au laboratoire. Des expérimentations à partir d'extraits aqueux (pour rechercher des mycosporines) et méthanoliques ont permis de préciser certaines caractérisations grâce au couplage avec des détecteurs à barette de diodes et des spectromètres de masse. Seuls *S. halei* et *S. montagneanum* présentent des signaux qui pourraient correspondre à des mycosporines dans leurs extraits aqueux.

Les appariements qui résultent de ces analyses phytochimiques permettent de distinguer 2 profils :

- 1- *S. evolutum*, *S. grande* et *S. halei* qui contiennent de l'acide lobarique
- 2- *S. dactylophyllum*, *S. graminosum*, *S. montagneanum* et *S. vesuvianum* *S. vulcani* qui contiennent de l'acide stictique.

Tous ces stéréocaulons contiennent le depside atranorine et un dérivé monoaromatique, l'acide méthylorcinolcarboxylique (MOC) qui en dérive mais aussi abondants soient-ils, ces deux composés n'ont pu être mis en évidence par le système d'ionisation de type Electrospray couplé à l'HPLC.

Des analyses de données moléculaires (séquences des deux gènes 5.8S et de la  $\beta$ -tubuline) ont été réalisées par la méthode de parsimonie par optimisation directe. Des résultats exploitables pour 8 espèces seulement ont permis leur intégration dans l'arbre phylogénétique réalisé par Hognabba dans une étude menée en 2006 et portant sur 49 espèces de stéréocaulons. Les représentants du sous-genre *Holostelidium* correspondant à nos trois spécimens de *S. montagneanum* constituent sur notre arbre un groupe monophylétique. En revanche, *S. halei* se lie aux cinq autres espèces caractéristiques de la sous-section *Aciculisporae* en formant un clade bien distinct.

Il n'y a donc pas de convergence évidente entre les critères morphologiques, génétiques et chimiques mais en l'occurrence et pour les deux espèces qui nous intéressent plus particulièrement (*S. halei* et *S. montagneanum*), la corrélation entre l'approche génétique et

l'approche chimique est meilleure qu'avec l'approche botanique pour laquelle le nombre de septa et le type de cortex des céphalodies sont les éléments les plus discriminants.

Ces deux lichens du genre *Stereocaulon* récoltés en zone montagneuse à Sumatra en des lieux différents, (*S. halei* au Mont Singgalang, 2500 m et *S. montagneanum* au Plateau Simanau, Solok, 1500m) ont plus particulièrement été étudiées dans le cadre d'une étude phytochimique. Ce genre de travail approfondi qui a été réalisé pour la première fois sur ces deux espèces a conduit à l'isolement et l'identification de 14 composés. La moitié de ces molécules ont été obtenues en quantité substantielle (supérieure à 20 mg), certaines représentant plusieurs centaines de mg (acide stictique, acide lobarique) voire plusieurs dizaines de grammes (atranorine). Ces molécules vont ainsi permettre d'enrichir les différentes chimiothèques existantes et serviront lors de campagnes de criblage sur des cibles biologiques variées.

Ces composés offrent une assez bonne diversité structurale avec **7 depsidones** :

- Une depsidone possédant des chaînes aliphatiques : l'acide lobarique **Sh4**
- Six depsidones avec un noyau lactonique, l'acide stictique **Sh6**, l'acide peristictique **Smo5**, l'acide cryptostictique **Smo6**, l'acide menegazziaïque **Smo7**, l'acide norstictique **Smo8** et l'acide peristictique de 9'-*O*-butyle **Smo10**.

Dans la fraction acétonique de *S. montagneanum*, nous avons isolé cinq composés qui correspondent au chemosyndrome de l'acide stictique avec une variation du degré d'oxydation au niveau du groupe en C-8 ( $R_1$  :  $-\text{CH}_2\text{OH}$  pour l'acide cryptostictique,  $\text{CHO}$  pour l'acide stictique et l'acide norstictique,  $\text{COOH}$  pour l'acide peristictique ou  $\text{OH}$  dans l'acide menegazziaïque) et le degré de méthylation phénolique ( $R_2 = \text{OCH}_3$  ou  $\text{OH}$ ).

L'acide peristictique et l'acide menegazziaïque ont été isolés pour la première fois du genre *Stereocaulon*.

En dehors de ces depsidones, à la fois très communes chez les lichens et ici relativement identifiantes d'un point de vue chimiotaxonomique, nous avons aussi isolé :

- **un depside** : l'atranorine (précipité **ShA, ShB et SmoA**))
- **un diphényléther** ; l'acide lobariol carboxylique, (**Sh5**)

Ce dernier se présente sous forme de rotamères dont l'analyse RMN des spectres enregistrés à plusieurs températures permet de proposer des structures de conformères qui sont en accord avec des études de modélisation moléculaire qui font apparaître essentiellement 2 conformères dominants.

L'origine naturelle de ce composé décrit pour la première fois à partir d'un organisme vivant a été vérifiée et il peut s'intégrer dans un schéma de biogénèse en lien avec l'acide lobarique.

Pour l'acide butylperistictique de 9'- *O*-butyle **Smo10** isolé avec plusieurs dérivés stictiques de *S. montagnaneum*, nos premiers essais sont en faveur d'une origine naturelle mais nous devons apporter des preuves supplémentaires compte tenu du fait que plusieurs dérivés de ce type ont été obtenus en tant qu'artefacts (Huneck and Tabacchi 1987; Honda, Pavan et al. 2010).

La présence de ces composés correspondant au chemosyndrome de type acide stictique chez ce lichen le différencie clairement de *S. halei* qui contient de l'acide lobarique. Nous pensons que la présence de l'un ou l'autre de ces composés est un caractère discriminant pour les lichens du genre *Stereocaulon*, même si au moins deux contre-exemples apparaissent au vu de la littérature (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992) décrivent en effet la présence simultanée de dérivés stictiques (ac. stictique et cryptostictique) et d'acide lobarique dans *S. azureum*. Solberg a mis en évidence la présence d'acide vésuvianique (dérivé stictique) dans *S. alpinum* en 1977 (Solberg 1977) et Seo rapportent quant à eux la présence d'acide lobarique et de dérivés, notamment des diphenyls éthers proches de l'acide lobariol carboxylique dans *Stereocaulon alpinum* récolté en Antartique (Seo, Sohn et al. 2009). *S. alpinum* peut être confondu (synonyme) avec *S. grande* pour lequel nous avons aussi trouvé des dérivés lobariques mais pas l'acide stictique lors des études réalisées en HPLC-masse. Une erreur est toujours possible dans l'identification de ces espèces très proches et dans le cadre d'une étude où les biomasses sont plus importantes, le ramassage dans un même biotope n'exclut pas la possibilité d'un mélange de plusieurs espèces, ce qui serait particulièrement à vérifier pour l'étude menée sur *S. azureum* par Gonzales et al en 1992 (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992).

Les lichens du genre *Stéréocaulon* sont des organismes tripartites c'est-à-dire qu'ils contiennent un mycobionte et deux photobiontes. L'algue verte *Trebouxia* forme la couche algale présente dans les branches phyllocladioïdes et le cyanobionte *Scytonema* est localisé dans un endroit limité du thalle, la céphalodie. Les cyanolichens forment volontiers des métabolites azotés dont ceux qui sont apparentés aux mycosporines ont de remarquables propriétés en tant que filtre UV (Singh, Rastogi et al. 2008). Les résultats du criblage orienté pour la recherche de composés azotés de type mycosporines que nous avons mené sur neuf espèces de *Stéréocaulon* ont permis de repérer leur présence dans les deux espèces récoltées en Indonésie : *S. halei* et *S. montagneanum*. Une étude ciblée sur les diverses parties du thalle

a été menée pour mettre en évidence une localisation élective de ces mycosporines au niveau du pseudopodétion. Les analyses réalisées sur l'extrait aqueux en HPLC couplée à un spectromètre de masse et un spectrophotomètre UV (barette de diodes) ont permis mettre en évidence la présence de composés ayant un profil apparenté à celui de cyclohexenimine mycosporines dans les céphalodies et celui d'oxomycosporines dans le reste du thalle, en particulier dans sa partie basale, proche des céphalodies. Les quantités disponibles pour *S. montagneanum* et la présence de céphalodies bien différenciées nous ont permis de débiter une purification pour isoler ces composés à partir d'une extraction quantitative réalisée à partir des parties basales du pseudopodétion. Des composés **Sma1** (type cyclohexenone avec un maximum d'absorption à 310 nm) et **Sma3** (type cyclohexenimine avec une absorbance maximale à 330 nm) ont été plus particulièrement analysés et restent à purifier ainsi que d'autres extraits polaires pour déterminer la structure précise de ces composés.

Les deux lichens étudiés ayant été collectés dans des endroits exposés au rayonnement solaire, nous avons plus particulièrement cherché à évaluer le potentiel photoprotecteur de leurs métabolites. Les molécules obtenues en quantité suffisante (> 20 mg) ont été testées pour leurs activités antioxydantes en évaluant leur effet anti radicalaire contre l'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) et leur aptitude à réduire le 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH). Leur activité cytotoxique contre une lignée cellulaire de mélanome B16 murin et une lignée de kératinocytes humains HaCaT ont montré que l'acide stictique avec une  $CI_{50}$  de l'ordre de 30  $\mu M$  était le composé le plus cytotoxique isolé sans pouvoir être qualifié de cytotoxique pour autant. Les composés lichéniques n'ont pas montré d'activité sur le test DPPH comparativement à l'acide ascorbique mais des activités plus convaincantes lors de l'expérience de piégeage de l'anion superoxyde notamment pour l'acide lobariol carboxylique ( $CI_{50} = 9 \mu M$ ) et les dérivés stictiques, le moins actif étant l'acide stictique ( $CI_{50} = 36 \mu M$ ). Seuls l'acide stictique et l'atranorine ont pu être évalués pour leur effet sur la mélanogénèse dans un test cellulaire plus consommateur en produit mais aucun effet sur la production de mélanine ou la stimulation de la tyrosinase n'a pu être observé.

Ces essais relativement décevants n'excluent pas que ces composés aient des actions marquées sur d'autres cibles. L'acide lobarique par exemple, a montré d'intéressantes actions en tant qu'inhibiteur de COX, de la 5- et 12-LOX (cyclooxygénase et lipoxygénases impliquées dans l'inflammation) (Ingolfssdottir et al, 1996, Bucar et al 2004). Plus récemment une activité inhibitrice de la Protéine Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) qui limite l'action de l'insuline et qui constitue une cible prometteuse dans le traitement antidiabétique a été mise en évidence pour l'acide lobarique et pour des composés diphényléthers très proches de



l'acide lobariol carboxylique que nous avons isolé de *S. halei*. Les composés obtenus en quantité importante seront proposés dans la chimiothèque nationale, ou inclus dans des programmes de criblage d'autant plus accessibles qu'ils sont de moins en moins consommateurs en produits et que nos molécules ne sont pas disponibles par ailleurs.

Il ressort de ce travail que l'étude des lichens offre de multiples facettes d'approche et de valorisation. La présence de certains types moléculaires peut apporter une réponse chimiotaxonomique face aux limites d'une approche seulement botanique ou moléculaire. Les lichens tripartites en particulier sont d'excellents modèles pour mieux comprendre les échanges chimiques particuliers qui interviennent entre les divers partenaires de ces structures symbiotiques complexes. Nous avons aussi pu constater la présence de microorganismes variés sur ces thalles lichéniques et intra cephalodial que nous avons observé en MEB. Ces microorganismes sont d'ailleurs considérés par certains auteurs comme un autre partenaire (bactériobionte) essentiel à la structuration du thalle lichénique. Les potentialités que cette niche écologique particulière offre pour un accès à des molécules bioactives produites par voie biotechnologique à partir des microorganismes cultivables sont particulièrement prometteuses.

## **Partie expérimentale**



---

## 1 Méthodes de séparation

### 1.1 Chromatographie sur couche mince (CCM) préparative

Les chromatographies préparatives sur couche mince ont été réalisées sur des plaques recouvertes de gel de silice 60 PF<sub>254</sub> (5-40 µm, MERCK), préparées au laboratoire.

### 1.2 Chromatographie sur colonne ouverte

Les chromatographies sur colonne ouverte ont été effectuées à pression atmosphérique sur gel de silice (40-63 µm, Kieselgel 60, MERCK 7667), sur gel de silice greffé C<sub>18</sub> (C<sub>18</sub> hydro Chromabond, Macherey Nagel, Duren, Germany 818145), sur gel de Séphadex LH-20 (Sigma-Aldrich) et sur de la résine sulfonate échangeuse de cations DOWEX 50W-X8 335345000) (copolymère de styrène et divinylbenzène, sur lequel sont greffés des groupements -SO<sub>3</sub>H).

### 1.3 Chromatographie sur colonne sous pression : chromatographie flash

L'appareil utilisé est un SPOT Liquid Chromatography Flash® (Armen Instrument) qui permet d'éluer sous pression (Plage de débit jusqu'à 250 ml / min avec plage de pression de retour jusqu'à 35 bar) les solutés. Les colonnes sont soit des colonnes pré-packées de silice (Super Vario Flash D26 cartridge SI60 40-63 µm, 30 g, MERCK), de silice greffée C<sub>18</sub> (SVF D26-RP18 25-40 µm, 31 g, MERCK), soit des colonnes de silice packées manuellement à l'aide de silice (40-63 µm, Kieselgel 60, MERCK 7667).

### 1.4 Chromatographie circulaire centrifuge: Chromatotron®

L'appareil utilisé est un Chromatotron® (Harrison Research modèle 8924) fonctionnant avec une pompe péristaltique. La phase stationnaire est constituée d'une plaque en verre circulaire (20 cm de diamètre) recouverte de silice (Silice GF<sub>254</sub>, 35-70 µm, MERCK 7730) additionnée de plâtre qui sert de liant sur une épaisseur de 3 mm.

### 1.5 Chromatographie liquide haute performance (HPLC) semi-préparative et préparative

Les séparations par HPLC semi-préparative ont été effectuées sur une colonne Kromasil®C<sub>18</sub> (5 µm, 250 x 10 mm, CIL Cluzeau, Ste Foy la Grande). Les séparations par HPLC préparative ont été réalisées sur colonne Lichroprep C<sub>18</sub> (300 x 39 mm, 12-25 µm, MERCK). La pompe est une pompe Kontron (ref. 325, Montigny le Bretonneux, France). La détection des pics se fait en ligne par une

lampe à barrettes de diodes (HPLC 540 DAD, Kontron instruments, Montigny le Bretonneux, France) à la (Brown) longueur(s) d'onde choisie(s).

---

## 2 Appareillages et techniques d'analyse

### 2.1 Microscopie

#### 2.1.1 Microscopie optique

Les échantillons sont examinés à l'aide d'une loupe binoculaire (Laboratoire Humeau) qui permet aussi de pratiquer des coupes précises. Les coupes d'apothécies et de thalle, les asques et les spores imprégnées ou non de colorant, sont ensuite montées entre lame et lamelle soit dans l'eau ou dans un colorant (le bleu coton lactophénol) et observées au microscope (Microscope OLYMPUS CX41) équipé d'un appareil photo numérique (OLYMPUS DP20).

##### Colorant utilisé :

- Le Bleu Coton au lactophénol : 0,1 g de bleu de méthyle sont dissous dans 20 g d'acide lactique. 20 mL d'eau bidistillée sont ajoutés ainsi que 40 g de glycérol puis 2 g de phénol. Ce colorant permet de mettre en évidence l'ornementation sporale ainsi que la chitine présente dans les parois des hyphes.

Des coupes ont été également réalisées collaboration avec A. Burel et V. Gouesbet de la plateforme microscopie électronique MRic/IFR140 après inclusion dans la paraffine. Préalablement, les échantillons (les céphalodies) ont été fixées dans un mélange de 2.5 % de formaldéhyde et 2 % de paraformaldéhyde dilués dans du tampon phosphate 0.2 M. Elles ont été ensuite coupées à l'aide d'un microtome LEICA à une épaisseur de 3  $\mu$ m, séchées puis réhydratées avant d'être colorées au HES (Hematoxyline-Erythrosine-Safran) et au Trichrome Masson au bleu.

#### 2.1.2 Microscopie électronique à balayage

Afin d'observer les échantillons au MEB, plusieurs étapes sont nécessaires. Les trois premières étapes ont été réalisées au laboratoire et les suivantes ont été réalisées par Monsieur Le Lannic du CMEBA de l'Université de Rennes 1.

Le microscope électronique à balayage (MEB) utilise un faisceau focalisé d'électrons à haute énergie pour produire une variété de signaux à la surface des échantillons solides. Les signaux qui proviennent des interactions de l'échantillon - électrons-révoient des informations sur l'échantillon, y compris la morphologie externe (texture), la composition chimique et la structure cristalline et l'orientation des matériaux constituant l'échantillon. Les domaines vont d'environ 1 cm à 5  $\mu$ m de largeur et peuvent être visualisées dans un mode de numérisation à l'aide des techniques conventionnelles MEB (grossissement allant de 20X à environ 30 000 X, la résolution spatiale de 50 à 100 nm).

#### *2.1.2.1 Prélèvement*

Les céphalodies sont prélevées et choisies de façon à être représentatives.

#### *2.1.2.2 1<sup>ère</sup> fixation*

La céphalodie est fixée par immersion en utilisant du glutaraldéhyde à 2,5 % et à pH 7,2 en tampon phosphate 0,1 M, à 4°C, pendant 48 heures. Le bain est changé 2 fois. Ensuite l'échantillon est lavé par le tampon. Ils permettent la formation de ponts moléculaires qui bloquent les réactions d'autolyse et stabilisent les structures. Le maintien de l'intégrité cellulaire est renforcé par l'utilisation de tampons adaptés dans lesquels seront dilués les fixateurs. NB, après la 1<sup>ère</sup> ou la 2<sup>ème</sup> fixation, il faut laver l'échantillon dans du Tampon pour éliminer le fixateur généralement par 2 - 3 bains de 10 - 15' chacun.

#### *2.1.2.3 Déshydratation*

L'échantillon est ensuite placé dans une série de bains d'éthanol de plus en plus anhydre (ex : 60, 70, 80, 90, 95 et 100 %) par bains de 1 heure et enfin par de l'acétone 100%. Ne pas confondre " déshydratation " et " séchage ". La déshydratation consiste seulement en un remplacement de l'eau par un ou plusieurs solvants organiques miscibles à l'eau (substitution chimique). A la fin de la déshydratation, les échantillons sont toujours immergés mais ne contiennent plus d'eau.

#### *2.1.2.4 Séchage – montage – métallisation*

Ces trois étapes sont réalisées au CMEBA:

Le séchage se fait par la méthode du “ Point critique ” avec du CO<sub>2</sub> liquide. La méthode utilise une propriété des liquides, à savoir la disparition de la limite des phases entre l'état liquide et l'état gazeux à des valeurs déterminées de température et de pression qui caractérisent le “ point critique ” d'un liquide donné. Au dessus du point critique, les densités du liquide et du gaz sont identiques, c'est à dire que la limite entre les deux états n'existe plus. L'eau ne permet pas d'atteindre facilement cet état d'équilibre (température : 374°C, pression : 3184 psi) et le CO<sub>2</sub> (température : 31°C, pression : 1072 psi ou 72 Atm) est un des liquides les plus adaptés (avec le fréon). Mais il faut utiliser un solvant miscible au CO<sub>2</sub> ce qui est le cas des solvants utilisés précédemment comme l'éthanol et acétone.

Concrètement, il faut disposer d'un instrument dans lequel les échantillons sont d'abord immergés dans le solvant intermédiaire (ex : acétone) à l'intérieur d'une chambre capable de subir de fortes pressions. Par un jeu de vannes d'entrée et de sortie de liquide dans cette chambre, on remplace peu à peu le solvant par du CO<sub>2</sub> liquide provenant d'une bouteille équipée d'un tube plongeant. Lorsque tout le solvant est éliminé, les échantillons sont toujours dans du liquide mais cette fois dans du CO<sub>2</sub> pur. Il suffit alors de chauffer légèrement l'ensemble ; la pression monte en même temps que la température jusqu'à atteindre le point critique du CO<sub>2</sub>. Tout en maintenant cette température au dessus du point critique, la pression est ramenée à zéro progressivement.

### Montage

Les échantillons secs à la sortie de l'appareil à point critique peuvent se réhydrater à l'air et il est préférable de les conserver dans un dessiccateur. Le mieux est de procéder au montage, à la métallisation puis à l'observation le rapidement possible. Les supports habituels sont des plots en Laiton ou en Aluminium qui assurent une bonne conductivité dans le MEB. Le collage des pièces se fait rapidement par de l'adhésif double-face ou un adhésif au Cu ou Al, plus lentement avec un vernis ou de la laque d'Ag qui doivent ensuite sécher. L'idéal est le collage au double-face renforcé par des points de contact à l'Ag.

## Métallisation

L'échantillon est collé à l'Or-Palladium par pulvérisation cathodique ou "sputtering". Cette méthode est rapide, peu encombrante, peu coûteuse et fiable. Elle ne nécessite qu'un vide maximum de  $10^{-3}$  Torr. Ce métalliseur comprend un pôle négatif qui est la cible d'Or ou Or-Palladium, et un pôle positif qui est le bâti sur lequel se trouvent les échantillons. L'état excité entre cette anode et cette cathode est caractérisé par une luminescence particulière qui est celle d'un "Plasma". A des valeurs choisies de tension (par champ électrique), il se produit une ionisation des molécules présentes sous la cloche à vide (Air ou Argon) provoquant un bombardement de la cathode et un arrachement d'atomes d'Or ou de Palladium qui viennent se déposer sur l'anode et plus particulièrement sur les échantillons.

Le dépôt est relativement uniforme ; l'épaisseur varie en fonction du temps à des valeurs fixes de tension et de courant. Théoriquement, le film conducteur couvre toute la surface, y compris les parties cachées, mais cela est approximatif pour les échantillons très poreux.

Les avantages de ce dépôt conducteur sont :

- éviter les charges électrostatiques en certains points qui brilleraient excessivement à l'observation,
- accroître l'émission d'électrons secondaires pour obtenir un meilleur contraste,
- protéger les surfaces sensibles de l'échauffement provoquant un déplacement, une destruction avec évaporation et donc altération du vide dans le MEB.

## *2.2 Réactions thallines*

Les réactifs utilisés sont les suivants :

Test K : solution de KOH à 10% dans l'eau

Test C : solution de NaClO, eau de javel commerciale

Test KC : solution K et C appliquées l'une après l'autre

Test PD : 1% de *p*-phénylène-diamine dans une solution de thiosulfate de sodium aqueuse (10%).



### 2.3 *Chromatographie sur couche mince (CCM)*

Les CCM ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice avec indicateur de fluorescence (10-12  $\mu\text{m}$ , Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, MERCK 5554). Après élution de la plaque dans une phase mobile appropriée, les plaques sont systématiquement observées sous lampe UV (à 254, 312 et 365 nm). Les chromatographies ont été ensuite révélées par une des solutions suivantes :

- Anisaldéhyde sulfurique : 0,5 mg de méthoxybenzaldéhyde dissous dans 85 ml de méthanol et 10 ml d'acide acétique glacial, additionnée extemporanément de 2% d'acide sulfurique concentré. Chauffage à 100°C après pulvérisation.
- Ninhydrine : 0,3 g de ninhydrine dissoute dans 100 ml de butanol et 3 ml d'acide acétique. Chauffage à 100°C après pulvérisation.

Les CCM ont été éluées à l'aide de trois systèmes standards de solvants (Huneck and Yoshimura 1996):

- *n*-hexane-diéthyléther-acide formique (130:80:20) (B)
- toluène-acétique (85:15) (C);
- toluène-AcOEt-acide formique (139:83:8) (G)
- *n*-hexane-AcOEt (95:5) (K) et  $\text{CHCl}_3$ -MeOH- $\text{H}_2\text{O}$  (60:40:10) (L)

### 2.4 *Chromatographie sur couche mince haute performance (HPTLC)*

Les CCM ont été réalisées sur des plaques d'aluminium recouvertes d'un gel de silice avec indicateur de fluorescence (10-12  $\mu\text{m}$ , Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, MERCK 5554). Les dépôts sont réalisés par un déposeur automatique d'échantillons ATS 4 CAMAG. L'élution se fait dans une cuve migration automatique ADC 2 CAMAG. Les chromatographies obtenues sont observées à l'aide du spectrophotodensitomètre TLC Scanner 3 CAMAG, qui permet de mesurer l'absorbance sur toute une gamme de longueurs d'onde, des composés préalablement séparés sur la plaque de CCM.

### 2.5 *Chromatographie liquide haute performances (HPLC) avec détecteur à barrettes de diodes (DAD)*

Les analyses ont été réalisées sur colonne C<sub>18</sub> Equisorb ODS2 (5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm, CIL Cluzeau, Ste Foy la Grande). Les pompes utilisées sont successivement une HPLC pump

325 de Kontron instruments (Montigny le Bretonneux, France), puis une Smartline pump 1000 de Knauer (Berlin, Germany). La détection des pics se fait en ligne par une lampe à barrettes de diodes (HPLC 540 DAD, Kontron instruments, Montigny le Bretonneux, France). Certaines analyses ont également été réalisées à Nantes et en Autriche et sont détaillées dans la partie traitée.

## 2.6 Spectrométrie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les différents appareils utilisés sont :

- Appareil à transformée de Fourier BRUKER proton Avance I 500 (500 MHz pour le proton et 125 MHz pour carbone 13) (CRMPO)
- Appareil à transformée de Fourier BRUKER proton Avance III 400 (400 MHz pour le proton et 100 MHz pour carbone 13) (CRMPO)
- Appareil à transformée de Fourier BRUKER WB proton Avance I 300 (300 MHz pour le proton et 75 MHz pour carbone 13) (CRMPO et Laboratoire EPNSCM)
- Appareil à transformée de Fourier JEOL GSX WB 270 (270 MHz pour le proton et 67,5 MHz pour carbone 13) (Laboratoire PNSCM)
- Appareil à transformée de Fourier BRUKER 500 (500 MHz pour le proton et 125 MHz pour carbone 13) (Plateforme PRISM) et pour la cryosonde.

Les spectres ont été réalisés dans différents solvants deutérés :  $\text{CDCl}_3$ , Acétone- $d_6$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{DMSO}-d_6$  et  $\text{D}_2\text{O}$ . Les déplacements chimiques ( $\delta$ ) sont exprimés en partie par millions (ppm), par rapport au tétraméthylsilane (TMS), utilisé comme référence interne. Les constantes de couplage ( $J$ ) sont exprimées en Hertz (Hz). La multiplicité des signaux est indiquée comme suit : s (singulet), bs (singulet large), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (doublet dédoublé).

## 2.7 Spectrophotométrie Ultra-Violet (UV)

Les spectres UV sont enregistrés sur un spectrophotomètre UVIKON 931 ; les échantillons sont dissous dans l'acétone ou dans le méthanol en fonction de leur solubilité à la concentration  $1 \times 10^{-4}$  mol/L.

Soit une radiation monochromatique de longueur d'onde fixe traversant un échantillon d'épaisseur  $l$ , l'absorbance vérifie la **loi de beer-lambert** soit :

$$A = \log I_0/I = \epsilon lC$$

Avec:

- A : absorbance
- $\epsilon$ : le coefficient d'absorption molaire en  $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
- l : la largeur de cuve en cm
- c : la concentration de la solution en mol/L

## 2.8 Spectrométrie de masse (MS)

Les spectres de masse haute résolution ont été réalisés sur deux types d'appareils disponibles au CRMPO.

- Spectromètre de masse ZABspecTOF, par electrospray (ESI). Le composé est dissous dans le méthanol. La mesure d'un ion est effectuée en utilisant comme référence des composés de type polyéthylèneglycol (PEG).
- Spectromètre de masse Bruker MicroTofQII, par electrospray.

D'autres analyses ont été réalisées à Nantes et les analyses basse résolution ont été réalisées sur une chaîne Thermo Finnigan Surveyor MS pump, équipée d'un autosampler, d'une DAD et d'un spectromètre de masse LCQ Deca XP MS. La colonne utilisée était une Phenomenex Synergi Hydro. D'autres analyses ont été réalisées en Autriche, les analyses haute résolution ont été réalisées sur un appareil Waters Synapt HDMS qTOF MS, couplé à une colonne UPLC Waters Acquity BEH C-18 ( $17\mu\text{m}$ ;  $2,1 \times 150 \text{ mm}$ ) pour la séparation chromatographique.

## 2.9 Spectrométrie Infra-Rouge (IR)

Les spectres infra-rouge sont réalisés sur un spectromètre à transformée de Fourier Perkin-Elmer FTIR 1600. Les échantillons solides et disponibles en quantité suffisante sont analysés après inclusion dans une matrice de KBr anhydre à une concentration de 1%. Les échantillons liquides ou disponibles en très faible quantité sont analysés par réflexion totale atténuée sur un cristal de sélénure de zinc.

Pour préparer un échantillon de liquide à l'analyse IR, une goutte de produit dissous dans l'acétone a été déposé sur le visage d'une plaque de film, puis étalée en une couche mince jusqu'à évaporation du solvant. Les fréquences d'absorption ( $\nu$ ) des groupements fonctionnels sont exprimées en  $\text{cm}^{-1}$  à leur maximum d'intensité.

### 2.10 Point de fusion (PF)

Les points de fusion des composés purs sont mesurés à l'aide d'une rampe Kofler LEICA VMHB.

### 2.11 Pouvoir rotatoire

Le pouvoir rotatoire  $[\alpha]_D^{25}$  est mesuré sur un polarimètre Perkin Elmer Model 341, à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm), à la température de 25°C.

$$[\alpha]_D^{25} = \frac{\alpha_D \text{ mesuré}}{(l \times C)}$$

$l$  = longueur de la cuve en cm ;  $C$  = concentration en g/L

### 2.12 Modélisation moléculaire

Les premières structures des composés ont été construites en utilisant le programme YASARA et paramétré pour le champ de force Yamber3 suivie de la procédure automatisée AutoSMILE. L'analyse de la trajectoire MD (RMSD, clustering) a été réalisée en utilisant des outils GROMACS (Krieger, Darden et al. 2004; Van-der-Spoel, Lindahl et al. 2005).

---

## 3 Criblage des différentes espèces de *Stereocaulon*

### 3.1 Lichens récoltés

Les échantillons récoltés en régions tempérées proviennent essentiellement de Bretagne et des Alpes pour la métropole ainsi que de Sicile pour l'Italie. Ceux qui sont en provenance de régions tropicales ont été récoltés sur des massifs volcaniques de l'île de la Réunion et d'Indonésie.

Espèce	Origine	Date de récolte	Lieu de récolte
<i>S. grande</i>	France	juillet 2009	La crèmerie du glacier, Haute Savoie, 1200 m
<i>S. dactylophyllum</i>	France	juillet 2010	Ardoisière de Commana, Bretagne,

			260 m
<i>S. evolutum</i>	France	novembre 2010	La Palette Rocher, St Just, Bretagne, 84 m
<i>S. evolutum bis apothecie</i>	France	mai 2010	Ardoisière de Commana, Bretagne, 260 m
<i>S. evolutum sans apothecie</i>	France	mai 2010	Ardoisière de Commana, Bretagne, 260 m
<i>S. vesuvianum</i>	Italie	mai 2002	Etna, Sicile
<i>S. halei</i>	Indonésie	novembre 2009	Mont Singgalang, Sumatra, 2800 m
<i>S. montagnanum</i>	Indonésie	janvier 2010	Vallée Simanau, Sumatra 1500 m
<i>S. graminosum</i>	Indonésie	novembre 2009	Mont Singgalang, Sumatra, 2800 m
<i>S. vulcani</i>	Ile de la Réunion	juillet 2010	Grand pays, vallée de rivière langevin, 1000 m
<i>S. scutelligerum</i>	Ile de la Réunion	juillet 2010	Grand pays, vallée de rivière langevin, 1000 m

### 3.2 Préparation des extraits

Le criblage a été réalisé à partir d'extraits aqueux et méthanoliques.

#### 3.2.1 Extraits aqueux

Pour chaque lichen, 100 mg de matière sèche sont pesés et placés dans un tube à hémolyse sans broyage. On ajoute 1 mL d'eau bidistillée froide, on bouche et on place à 4 °C pendant 3 heures. Les surnageants sont récupérés par filtration sur coton et

évaporés à sec au SpeedVac à 40 °C pendant 2h. Les extraits secs sont ensuite pesés et conservés au congélateur.

La purification de chaque extrait se fait sur résine échangeuse d'ions DOWEX selon le protocole défini précédemment.

#### 3.2.1.1 *Purification*

300 mg de résine sulfonate échangeuse de cations : DOWEX 50W-X8 (copolymère styrène + divinylbenzène, sur lequel sont greffés des groupes  $-SO_3H$ ) sont pesés, lavés abondamment (au MeOH puis à l'eau) et dégazés avant d'être coulés dans une colonne de  $50 \times 10$  mm. La résine est convertie en  $H^+$  par le passage de 5 volumes de HCl à 1M. Puis l'excédent de HCl est éliminé de la résine avec de l'eau ultra-pure jusqu'à ce que l'effluent ait un pH supérieur à 5. L'extrait sec repris dans 100  $\mu$ L d'eau est déposé en haut de la colonne. 3 mL d'eau sont élués (correspondant à l'élution des composés non retenus, notamment les polyols). Puis 200  $\mu$ L d'une solution de NaCl à 200 mg/mL sont alors ajoutés en haut de colonne pour décrocher tous les composés retenus sur la colonne (et notamment les mycosporines et MAAs) et une fraction de 2 mL est recueillie. Cette fraction est ensuite évaporée à sec au SpeedVac pendant 3 heures à 35 °C.

Afin d'éliminer l'excédent de NaCl se retrouvant dans la fraction purifiée, le résidu sec est repris dans 500  $\mu$ L d'EtOH et centrifugé à 3000 tr/min pendant 5 min. Le NaCl non soluble dans l'EtOH est alors éliminé, en reprenant le surnageant. Celui-ci est alors évaporé à sec au SpeedVac pendant 45 minutes à 35 °C.

#### 3.2.1.2 *Préparation de l'extrait*

L'extrait semi-purifié est repris par 250  $\mu$ L d'eau ultrapure, centrifugé à 3000 trs/min pendant 5 min et le surnageant est filtré (0,45  $\mu$ m) et transféré dans une cupule avec réducteur. Ainsi, la concentration des échantillons aqueux est différente d'une espèce à l'autre et tel que :

Lichen	concentration en mg / ml
<i>S. grande</i>	7,72
<i>S. vesuvianum</i>	7,76
<i>S. halei</i>	7,4
<i>S. montagneanum</i>	6,68
<i>S. graminosum</i>	3,8
<i>S. vulcani</i>	2,4
<i>S. evolutum bis apothécie</i>	4,96
<i>S. evolutum sans apothécie</i>	2
<i>céphalodies</i>	5,64
<i>S. scutelligerum</i>	5,56

### 3.2.2 Extraits méthanoliques

Le lichen précédemment extrait par de l'eau est ensuite mis à sécher. Une fois sec, il est mis au robot (Heidolph Synthesis™) dans 5 ml de méthanol pendant 2 heures à 21°C sous agitation constante (1000 rpm). Le 1<sup>er</sup> filtrat obtenu est mis de côté puis une 2<sup>ème</sup> extraction est réalisée dans les mêmes conditions. Les deux filtrats sont alors rassemblés puis évaporés afin de calculer le poids d'extrait sec obtenu.

### 3.3 HPTLC-UV

Les appareils utilisés sont accessibles sur la Plateforme ONIS et se composent :

- d'un déposeur d'échantillons Automatic TLC Sampler III
- d'une cuve de migration automatique
- d'une plaque chauffante CAMAG
- d'un scanner 3 pour CCM
- d'une chambre photographique reprostar CAMAG

Grâce à cette chaîne d'appareils, les extraits aqueux et méthanoliques vont être analysés.

### 3.3.1 Extraits aqueux

Dépôt : 40 µl

Solvant de migration : CHCl<sub>3</sub>/MeOH/H<sub>2</sub>O (6 :4 :1) de qualité HPLC

Longueurs d'onde observées : 220, 250, 280, 310, 340, 370 nm

### 3.3.2 Extraits méthanoliques

Dépôt : 20 µl

Solvant de migration : toluène / acétate d'éthyle / acide formique (70:20:5)

Longueurs d'onde observées : 254, 365 nm

Après chaque développement dans le système solvant, les plaques sont lues dans le visible, puis à 254 et 365 nm avant d'être révélées par pulvérisation avec le réactif anisaldéhyde sulfurique et chauffage. Une photographie peut alors être effectuée.

## 3.4 HPLC-DAD

Les extraits aqueux et méthanoliques ont été analysés par HPLC (pompe Smartline pump 1000 –Knauer) couplée à une barrette de diode (Kontron, DAD 540). L'acquisition des données a été réalisée grâce au logiciel Geminix.

### 3.4.1 Extraits aqueux

Phase stationnaire : Equisorb ODS2 5 µ (250 mm x 4,6 mm)

Phase mobile : A (Eau bidistillée + acide acétique 0,2 %) et B (méthanol)

Débit : 0,7 mL / min

Conditions : 0 à 25 min : A / B ( 97/ 3 )

26 min à 36 min : A / B ( 97/ 3 ) à A / B ( 100 / 0 )

37 min à 48 min : A / B ( 0 / 100 ) à A / B ( 97/ 3 )

48 min à 53 min : A / B ( 97/ 3 )

Injection : 20 µl

Longueurs d'onde observées : 254, 310, 330 nm



### 3.4.2 Extraits méthanoliques

Phase stationnaire : Equisorb ODS2 5  $\mu$  ( 250 mm x 4,6 mm )

Phase mobile : A (Eau bidistillée) et B (acétonitrile)

Débit : 0,3 mL / min

Conditions : 0 à 40 min : gradient de A / B ( 100 / 0 ) jusqu'à A/B (0 / 100)

41min à 66 min : A/B (0/100)

67 min à 81 min : A/B (0/100) à A / B ( 100/ 0 )

81 min à 107 min : A / B ( 100/ 0 )

Injection : 20  $\mu$ l

Longueurs d'onde observées : 254, 310, 365 nm

L'exactitude des valeurs pour les longueurs d'onde est de 3 nm.

### 3.5 HPLC-DAD-MS

- Echantillons passés à Nantes (collaboration avec le Dr Olivier Grovel, Equipe MMS, EA 2160, l'université de Nantes)

#### 3.5.1 Extraits aqueux

Phase stationnaire : Equisorb ODS2 5  $\mu$  (250 mm x 4,6 mm)

Phase mobile : A (Eau bidistillée) et B (methanol)

Débit : 0.3 mL / min

- 0 à 40 min : gradient de A / B (100 / 0) jusqu'à A/B (0 / 100)
- 41min à 66 min : A/B (0/100)
- 67 min à 81 min : A/B (0/100) à A / B (100/ 0)
- 81 min à 107 min : A / B (100/ 0)

Volume injecté : 5  $\mu$ l

Pompe HPLC : Spectraphysics Spectra System P2000 pump

Passeur d'échantillon : AS 100XR autosampler (Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA)

Source d'ionisation : Spectromètre (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) avec trappe d'ions et ionisation LCQ électrospray. Conditions : mode positif, 4.5kV, débit gaz dans la source et auxiliaires : 75 et 24 ; voltage / température du capillaire : 16V/200°C

Mass range ( $m/z$ ) : 150-1200. Energie de collision pour MS<sup>2</sup> : 35%

Logiciel d'acquisition : Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific)

- Echantillons passés en Autriche

Les extraits purifiés ont tous été analysés par trois systèmes différents, grâce à la collaboration du laboratoire du Pr R. Bauer à Graz en Autriche.

Tout d'abord, un système HPLC-DAD, permet de repérer la présence de mycosporines (spectre d'absorption UV caractéristique). Il a été utilisé un système Agilent 1100 Series équipé d'une DAD G1315B, sur une colonne Phenomenex Synergi Hydro (150 x 2 mm ; 4 µm), selon les conditions suivantes :

- Débit : 230 µL/min
- Solvant A : eau + 0,1% d'acide formique ; Solvant B : MeOH + 0,1% d'acide formique
- Gradient utilisé :
  - 0 - 7 min : 100% A
  - 7 - 25 min : 0-100% B
  - 25 - 30 min : 100% B
  - 30 - 31 min : 0-100% A
  - 31 - 40 min : rééquilibration
- Injection: les extraits sont solubilisés dans 1 mL d'eau et 5 µL sont injectés dans la colonne
- Détection : à 205, 254, 310 et 330 nm

Ensuite, un système HPLC-DAD-MS a permis de mesurer la masse basse résolution des composés susceptibles d'être des mycosporines, et également d'accéder à des profils de fragmentation. C'est un système de type Thermo Finnigan Surveyor MS pump qui a été utilisé sur une colonne Phenomenex Synergi Hydro, selon les mêmes conditions que précédemment. La masse a été mesurée à la fois en mode positif par ESI :

- Température du capillaire : 270 °C
- Sheath gas: 70 arb. U
- Auxiliary gas : 10 arb U
- Ion spray voltage : 4.5 kV
- Capillary voltage 35 V

### 3.5.2 Extraits méthanoliques

Phase stationnaire : Equisorb ODS2 5 µ ( 250 mm x 4,6 mm )

Phase mobile : A (Eau bidistillée) et B (acétonitrile)

Débit : 0.3 mL / min

- 0 à 40 min : gradient de A / B (100 / 0) jusqu'à A/B (0 / 100)
- 41min à 66 min : A/B (0/100)
- 67 min à 81 min : A/B (0/100) à A / B (100/ 0)
- 81 min à 107 min : A / B (100/ 0)

Volume injecté : 5 µl

Pompe HPLC : Spectraphysics Spectra System P2000 pump

Passeur d'échantillon : AS 100XR autosampler (Thermo Separation Products, San Jose, CA, USA)

Source d'ionisation : Spectromètre (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) avec trappe d'ions et ionisation LCQ électrospray. Conditions : mode négatif, 4.5kV, débit gaz dans la source et auxiliaires : 75 et 24 ; voltage / température du capillaire : 16V/200°C

Mass range ( $m/z$ ) : 150-1200. Energie de collision pour MS<sup>2</sup> : 35%

Logiciel d'acquisition : Xcalibur software (Thermo Fisher Scientific)

### 3.6 Etude phylogénétique

(Collaboration avec Dr Annie GUILLER, UMR CNRS 6553 - Equipe SCA, Université Rennes 1)

Pour la réalisation de cette approche phylogénétique, l'ADN génomique des lichens a été extrait au moyen du KitDNeasy® Plant Mini Kit (50) (QIAGEN). L'amplification de l'ADN extrait est réalisée par PCR. La région amplifiée (ITS1-5.8S-ITS2) est située entre les gènes codant les différentes sous-unités de l'ARN ribosomique ; ITS1 se situe entre les gènes 18S (SSU RNA) et 5.8S et ITS2 entre les gènes 5.8S et 28S (LSU RNA). Le couple d'amorces retenu parmi les trois oligonucléotides préalablement testés (ITS-1, ITS4, ITS5 ;) est formé par :

- ITS4-F (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')
- ITS5-R (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3').

### 3.6.1 *Extraction et amplification de l'ADN*

Le matériel végétal à étudier est composé de 1 ou 3 individus (Tableau 22) de chacun des espèces de *Stereocaulons*. Ils sont individuellement broyés au mortier le plus finement possible et entre 5 et 90 mg de ce broyat sert de base pour l'extraction. Plusieurs étapes sont alors réalisées :

- (1) la lyse cellulaire (AP1 et RNase A),
- (2) la précipitation des protéines et des polysaccharides (AP2),
- (3) l'élimination des débris cellulaires et des précipités (centrifugation),
- (4) la fixation de l'ADN sur la membrane (AP3/E),
- (5) le lavage de l'ADN assurant l'élimination des protéines et des polysaccharides (AW),
- (6) l'élution de l'ADN (AE) dans 150 µl d'eau ultra pure.

Le mélange réactionnel comprend (1) 12,5 µl d'une solution 'MIX' (Polymérase Taq, dNTP, MgCl<sub>2</sub> principalement ; DiamondMix 2X de Bioline ou MasterMix 2X Promega), (2) 0.6 µl de chacune des amorces ITS-4F et ITS-5R, (3) 10.05 µl d'H<sub>2</sub>O, (4) 1.25 µl d'ADN extrait.

L'amplification est faite dans un thermocycleur (Thermo Hybaid PCRexpress Perkin Elmer ou 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems) selon le programme suivant : dénaturation initiale de l'ADN à 94°C pendant 5 min puis, 35 cycles à 94°C pendant 30 s, 55°C pendant 30 s et 72°C pendant 45 s. L'amplification est contrôlée sur gel d'agarose à 2 % et TBE 0,5X en déposant 4 l de produit PCR avec 1,5 l de tampon de charge. Après migration à 120 V pendant 20 min, le gel est visualisé sous UV afin de confirmer l'amplification de l'ADN pour les différents échantillons. Le séquençage double-brin des produits de PCR est fondé sur la méthode de Sanger. Cette étape est prise en charge par la Plate-forme Génomique Biogenouest de Nantes.

**Tableau 22. Poids des spécimens de lichens recueillis pour réaliser l'étude phylogénétique**

espèce de <i>Stereocaulon</i>	poids 1 <sup>er</sup> échantillon (g)	poids 2 <sup>ème</sup> échantillon (g)	poids 3 <sup>ème</sup> échantillon (g)
<i>S. halei</i>	14.5	7.2	13
<i>S. montagneanum</i>	23.1	20	21
<i>S. grande</i>	12.7	-	-
<i>S. vulcani</i>	14.4	12	5,2
<i>S. graminosum</i>	57	57	12,4
<i>S. evolutum</i>	44.2	-	-
<i>S. scutelligerum</i>	5	12,7	11,7
<i>S. dactylophyllum</i>	12.7	-	-
<i>S. vesuvianum</i>	78	90,7	93,4

### 3.6.2 Analyse des données

L'alignement des séquences consensus obtenues après correction des séquences 'simple-brin' a été réalisé au moyen du logiciel Codon code aligner 3.7.1 (CodonCode Corp., Dedham, MA). La reconstruction d'arbres établissant les relations phylogénétiques entre les haplotypes (ITS1-5.8SITS2, 486 pb) des espèces est fondée sur le modèle d'inférence bayésienne utilisant le logiciel MrBAYES v3.1.1. Cette approche, basée sur la distribution des probabilités postérieures des arbres, est la probabilité d'obtenir un arbre selon les données. Dans la mesure où la distribution des probabilités postérieures des arbres est impossible à calculer, MrBayes utilise une technique de simulation appelée Markov Chain Monte Carlo (MCMC) pour approximer ces probabilités. Le modèle de substitutions nucléotidiques correspondant le mieux aux séquences « *Stereocaulon sp.* » a été choisi au moyen du logiciel MrAIC v1.4.2. Ce programme calcule des scores de vraisemblance du jeu de données sous 24 modèles de substitution puis compare et classe les critères de Akaike (AIC, AICc, BIC) correspondants à chacun des modèles testés. Le modèle optimal retenu pour la région analysée du gène ITS1-5.8S-ITS2 est le modèle K2PG (K2P : modèle de Kimura à deux paramètres intégrant des taux de substitution différents pour les transitions et les transversions ; G : taux de substitution différents pour chaque site distribués selon une loi gamma). L'out group sélectionné est constitué d'un individu appartenant au genre *\_iebla*. Des réseaux d'haplotypes ont également été construits à l'aide du logiciel NETWORK v4.2.0.1 en raison de leur plus grande adaptation dans la reconstruction d'une phylogénie intra-spécifique.

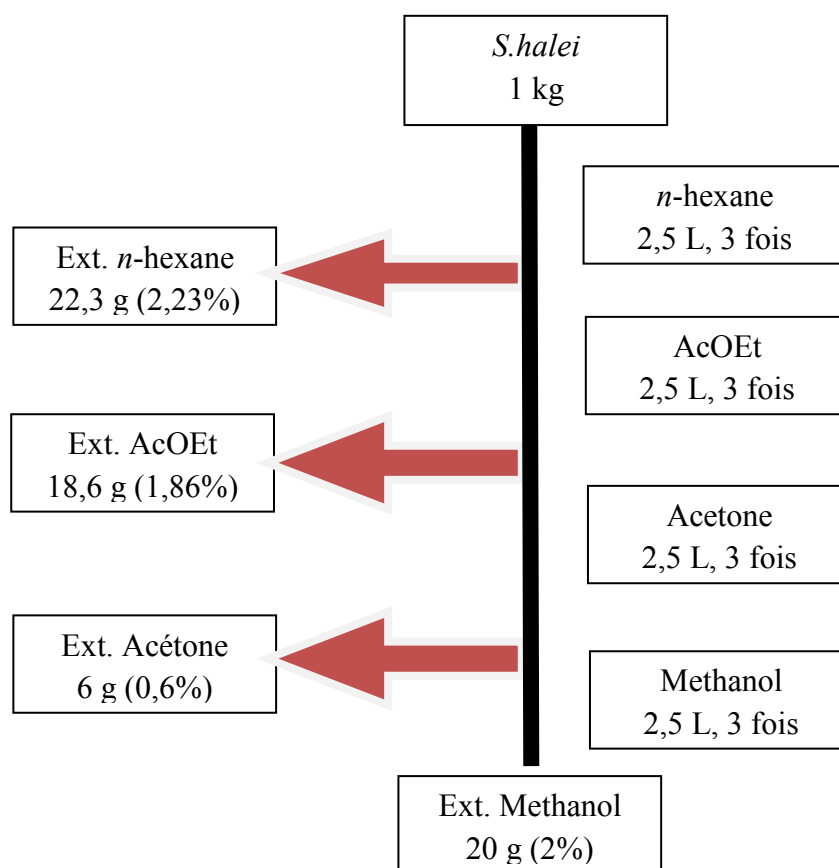
## 4 Etude phytochimique de *Stereocaulon halei*

### 4.1 Récolte de lichen

*Stereocaulon halei* Lamb a été récolté en novembre 2009 sur les rochers du Mont Singgalang (2,877 m), ouest de Sumatra, Indonésie. Après identification par Harrie Sipman (Musée de Berlin) et Olivier Bricaud (Association Française de Lichénologie), les spécimens ont été déposés à l'herbier du département de pharmacognosie et mycologie, Rennes et biote laboratoire de Sumatra, Université d'Andalas, Ouest de Sumatra (Indonésie) avec le numéro de référence JB/09/117 et SPE 1 respectivement.

#### 4.1.1 Extraction

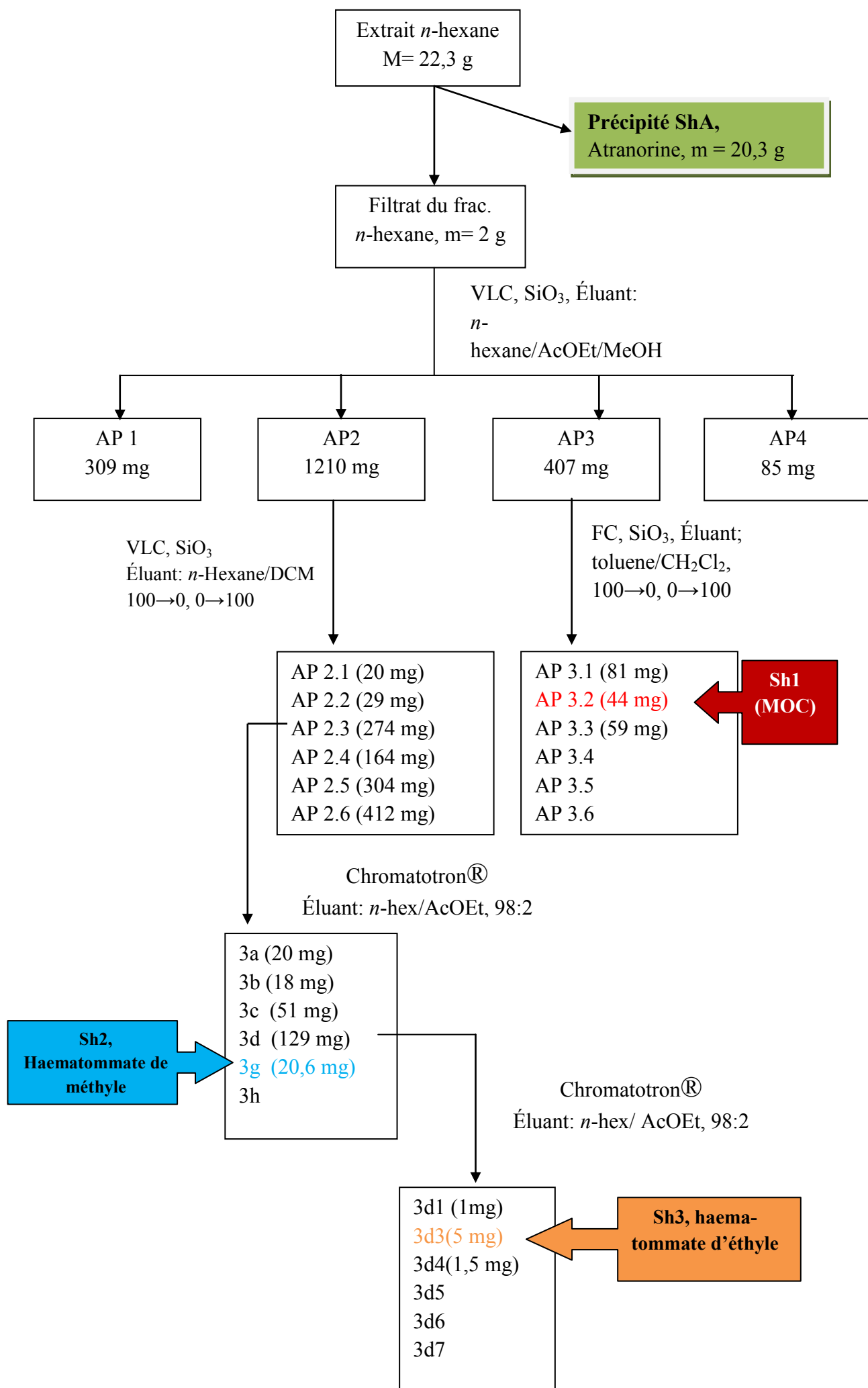
Le lichen *S. halei* a été trié de ses impuretés comme la mousse, le sol, la pierre et séché à température ambiante. Le lichen (1 kg) a ensuite été broyé à l'aide d'un blender et le tout est versé dans une bouteille de 3 L. On a ajouté 2,5 L de *n*-hexane et on a laissé en contact avec la matière première 2 jours sous agitation, à température ambiante. L'opération est répétée trois fois, avec 3 fois 2,5 L de *n*-hexane. Après avoir soutiré le filtrat, le lichen a été extrait avec de l'acétate d'éthyle, puis de l'acétone, puis du méthanol et enfin de l'eau dans les mêmes conditions.



#### 4.1.2 Séparation et purification des extraits

##### 4.1.2.1 Purification de l'extrait *n*-hexane

Le filtrat ( $m = 2$  g) est chromatographié sur une colonne de silice en utilisant un gradient d'élution allant de 100% de *n*-hexane, AcOEt à 100% de MeOH. 4 fractions sont ainsi obtenues AP1 à AP4. La fraction AP3 (407 mg) est purifiée par une chromatographie flash sur gel de silice. L'élution est réalisée par un mélange toluène /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 :0 à 0 :100). On récolte 70 fractions de 10 mL chacune. Après réunion des fractions selon leurs profils CCM, 6 fractions sont obtenues (AP3.1 à AP3.6). La réunion des fractions AP3.2 conduit à l'obtention de 44 mg du composé **Sh1**. La fraction AP2 (1,2 g) est chromatographiée sur une colonne de silice avec comme phase mobile *n*-hexane /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 100 jusqu'à  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  pur pour fournir 30 fractions de 5 mL. La réunion de ces fractions selon leur profil CCM permet d'obtenir les fractions AP2.1 à AP2.6. 274 mg de la fraction AP2.3 sont alors purifiés par chromatographie circulaire (phase mobile : *n*-hexane / AcOEt, 98 :2) pour obtenir 20 mg d'un composé cristallin jaune, le composé **Sh2**. 129 mg de la fraction 3d sont alors purifiés par chromatographie circulaire (phase mobile : *n*-hexane / AcOEt, 98 :2) pour obtenir 5 mg d'un composé cristallin jaune, le composé **Sh3**.

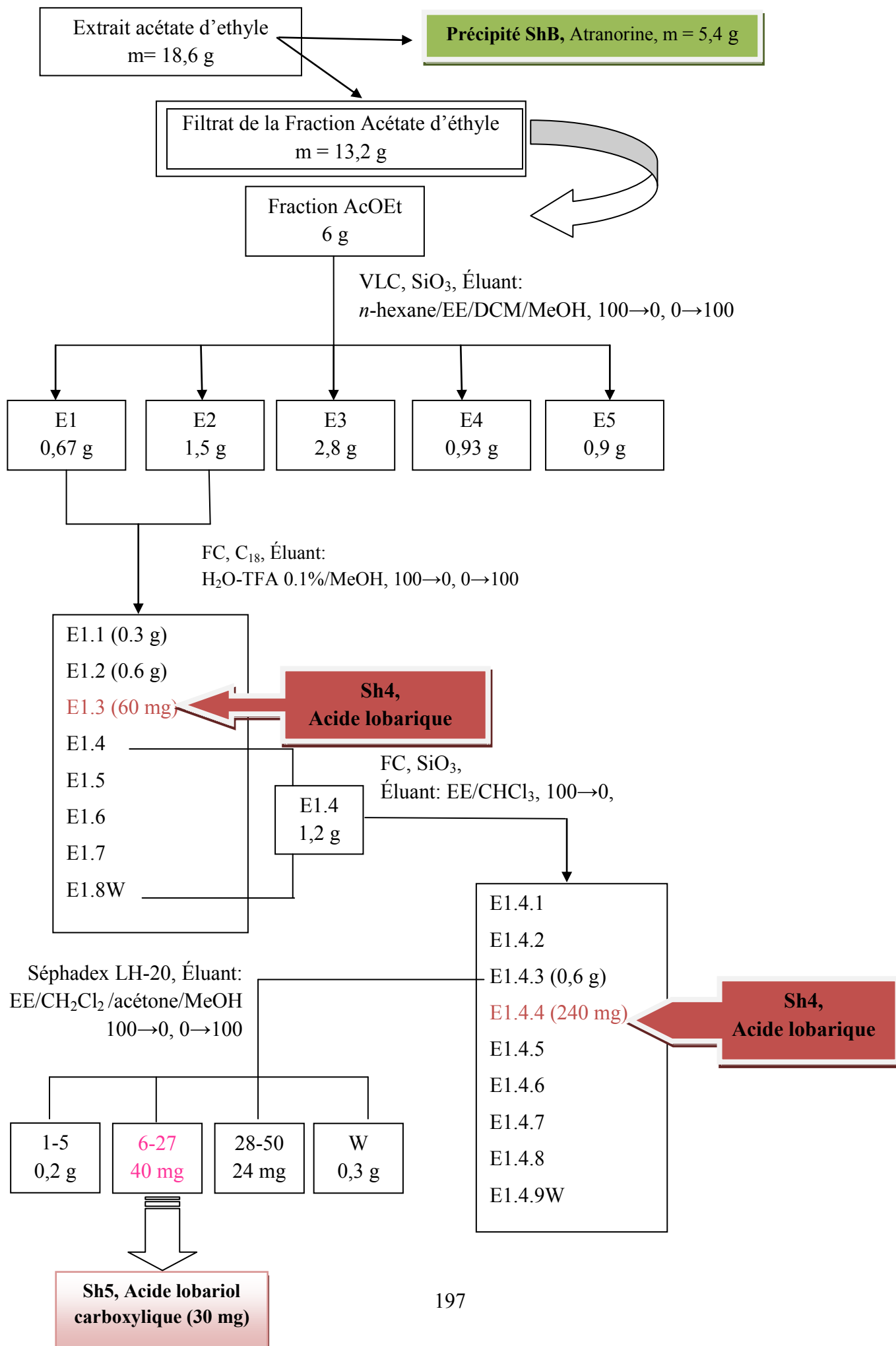




#### 4.1.2.2 Purification de l'extrait EtOAc

L'extrait EtOAc (6 g) est chromatographié sur colonne de silice utilisant un gradient *n*-hexane/EE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH pour obtenir 10 fractions de 100 mL. Après réunion des fractions ayant un profil CCM comparable, nous obtenons 4 fractions (E1 (les fractions E1 et E2 sont combinées, comme profil similaire en CCM) à E5). La fraction E1 (2165 mg) est purifiée par une chromatographie flash sur gel de RP C18. L'élution est réalisée par un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O, TFA 0.1%, 100 :0 à 0 :100. On récolte 99 fractions de 10 mL chacune. Après réunion des fractions selon leurs profils CCM, 8 fractions sont obtenues (E1.1 à E1.8). Dans la fraction E1.3, le composé **Sh4** est obtenu par recristallisation du produit dans le solvant EE/MeOH/H<sub>2</sub>O 40:50:10. La fraction de l'E1.4 (1,2 g), qui est une combinaison des fractions E1.4 à E1.8, est purifiée par une chromatographie flash sur gel de silice. L'élution est réalisée par un mélange EE / CHCl<sub>3</sub>, 100 :0 à 0 :100. On récolte 99 fractions de 10 mL chacune. Après réunion des fractions selon leurs profils CCM, 9 fractions sont obtenues (E1.4.1 à E1.4.8). A partir de la fraction E.1.4.4, le composé **Sh4** est de nouveau isolé (240 mg).

La fraction E1.4.3 (600 mg) est chromatographiée par colonne sur gel de Sephadex® LH-20 en éluant par EE/ CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Acétone/MeOH, 100:0 à 0 :100, pour donner quatre fractions. Le lavage de cette fraction 6-27 par le EE et MeOH permet d'obtenir 30 mg de produit pur **Sh5**.

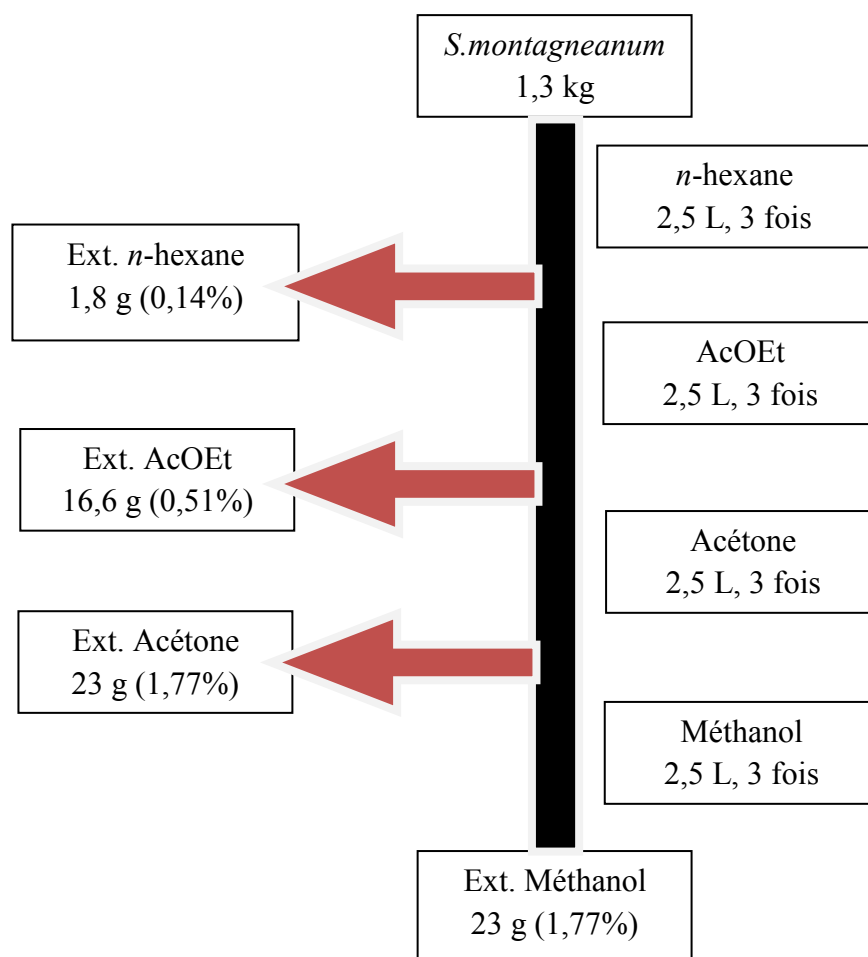


## 5 Etude phytochimique de *S. montagneanum*

### 5.1 Récolte de lichen

*Stereocaulon montagneanum* Lamb a été recueilli sur le rocher du Plateau Simanau (1500 m), Solok, Ouest de Sumatra, Indonésie. Après identification par Harrie Sipman (Musée de Berlin) et Martin Grube (Université de Karl-Franzens, Graz, Autriche), les spécimens ont été déposés à l'herbier de pharmacognosie et mycologie, Rennes et biote laboratoire de Sumatra, Université d'Andalas, Ouest de Sumatra (Indonésie) avec le numéro de référence JB/09/119 et SmV 3 respectivement.

### 5.2 Extraction



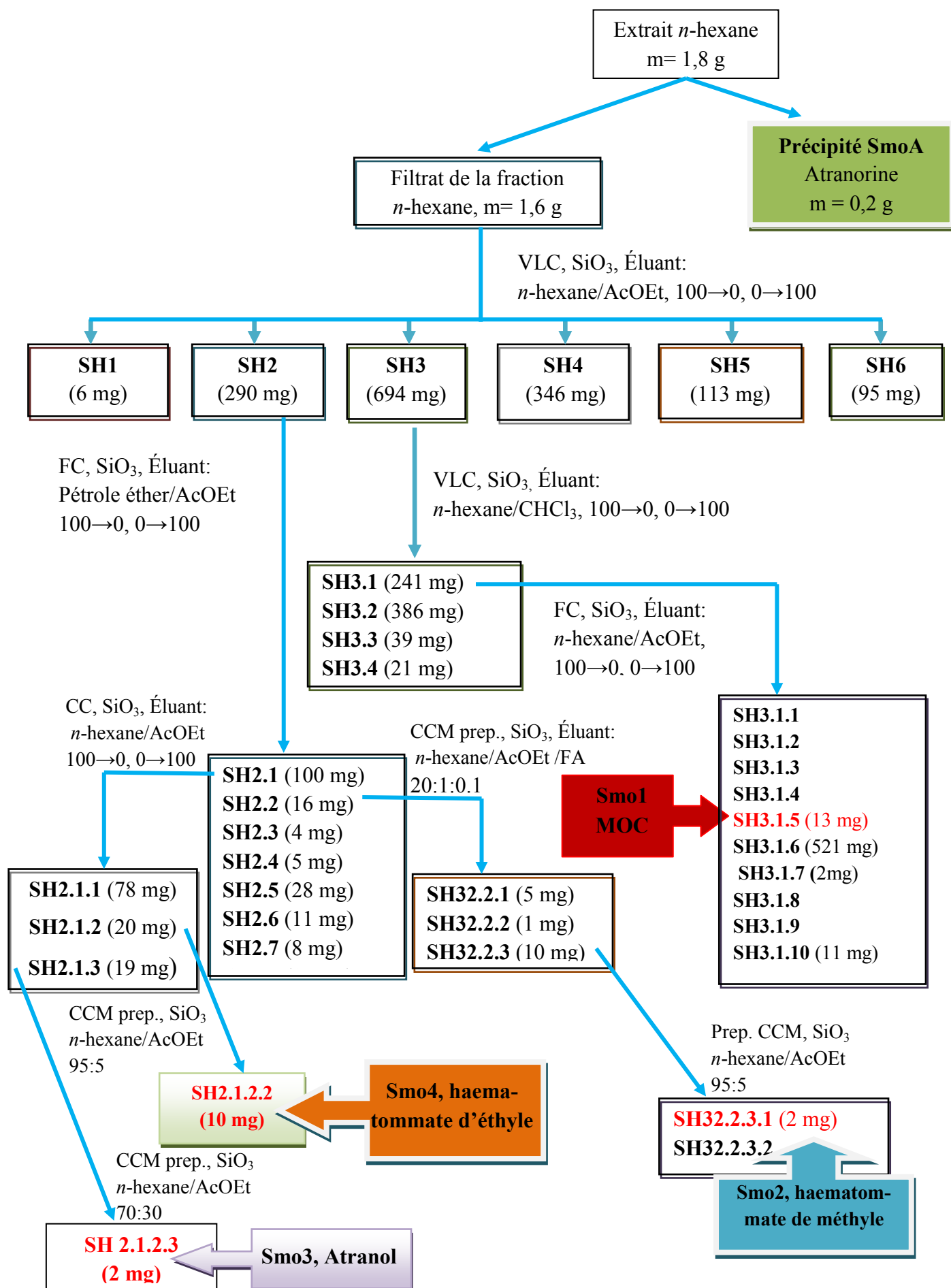
Le lichen *S. montagneanum* a été trié d'impuretés existantes comme la mousse, le sol, la pierre et séché à l'air libre à température ambiante. Le lichen (1,3 kg) est ensuite broyé à l'aide d'un blender et le tout est versé dans une bouteille de 3 L. On ajoute 2,5 L de *n*-hexane, on laisse en contact avec la matière première 2 jours puis on met sous agitation, à température

ambiante. L'opération est répétée trois fois, avec 3 x 2,5 L de *n*-hexane. Après avoir soutiré le filtrat, le même lichen est ensuite extrait à l'AcOEt, à l'acétone et méthanol, respectivement et avec l'égalité de traitement (la répétition des 3 fois 2,5 L des solvants)

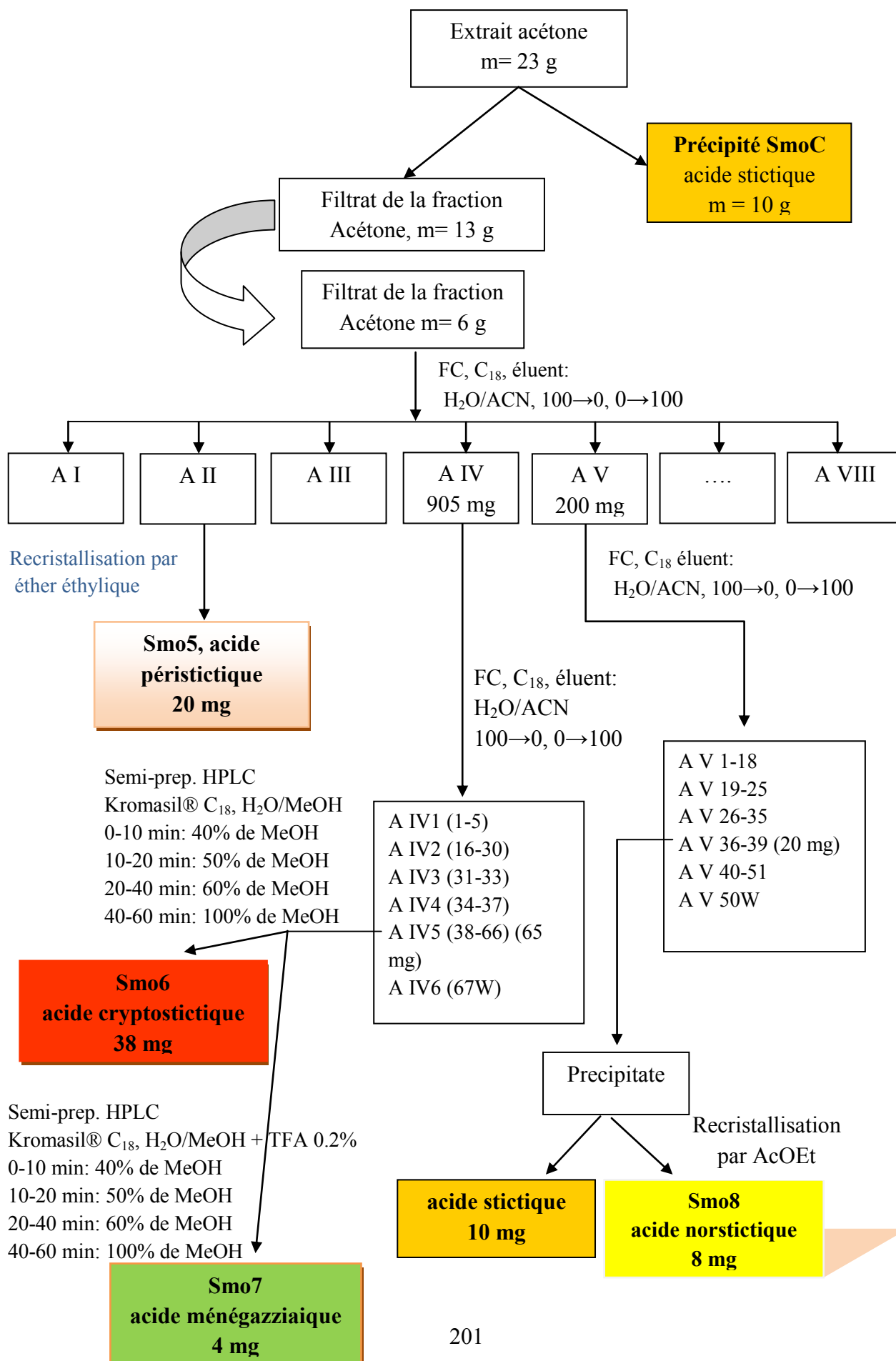
### 5.3 Séparation et purification des extraits

#### 5.3.1 Purification de l'extrait *n*-hexane

Le filtrat (m= 1,6 g) est chromatographié sur une colonne de silice en utilisant un gradient d'élution allant de 100% de *n*-hexane, AcOEt à 100% de MeOH. 6 fractions sont ainsi obtenues SH1 à SH6. La fraction SH3 (694 mg) est purifiée par une chromatographie ouverte sur gel de silice. L'élution est réalisée par un mélange *n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> 100 :0 à 0 :100. On récolte 4 fractions (SH3.1-SH3.4) et suivie d'une purification de la fraction de SH3.1 (241 mg) par flash chromatographie sur une colonne de silice avec comme solvants *n*-hexane/AcOEt, 100 :0 à 0 :100. Le **Smo1** (13 mg) est obtenu sous forme d'un composé cristallin. La fraction SH2 (290 mg) est purifiée par flash chromatographie sur une colonne de silice avec comme solvants de pétrole éther/AcOEt, 100 :0 à 0 :100 pour fournir 50 fractions de 10 mL. La réunion de ces fractions selon leur profil CCM permet d'obtenir les fractions SH2.1 à SH2.8. La fraction SH2.1 (100 mg) est chromatographiée sur une colonne de silice avec comme phase mobile *n*-hexane/AcOEt, 100 jusqu'à AcOEt pour obtenir trois subfractions SH2.1.1 à SH2.1.3. Les fractions SH2.1.2 (20 mg) et SH2.1.3 (19 mg) ont été purifiées des préparatives CCM (solvants : *n*-hexane/AcOEt 95:5 et 70:30). Les composés **Smo3** (2 mg) et **Smo4** (10 mg) ont été obtenus. La fraction SH2.2 (16 mg) sont alors purifiés par CCM préparative (phase mobile : *n*-hexane/AcOEt/AF, 20:1:0.1 et *n*-hexane/AcOEt, 95:5) pour obtenir 2 mg d'un composé cristallin, le composé **Smo2**.

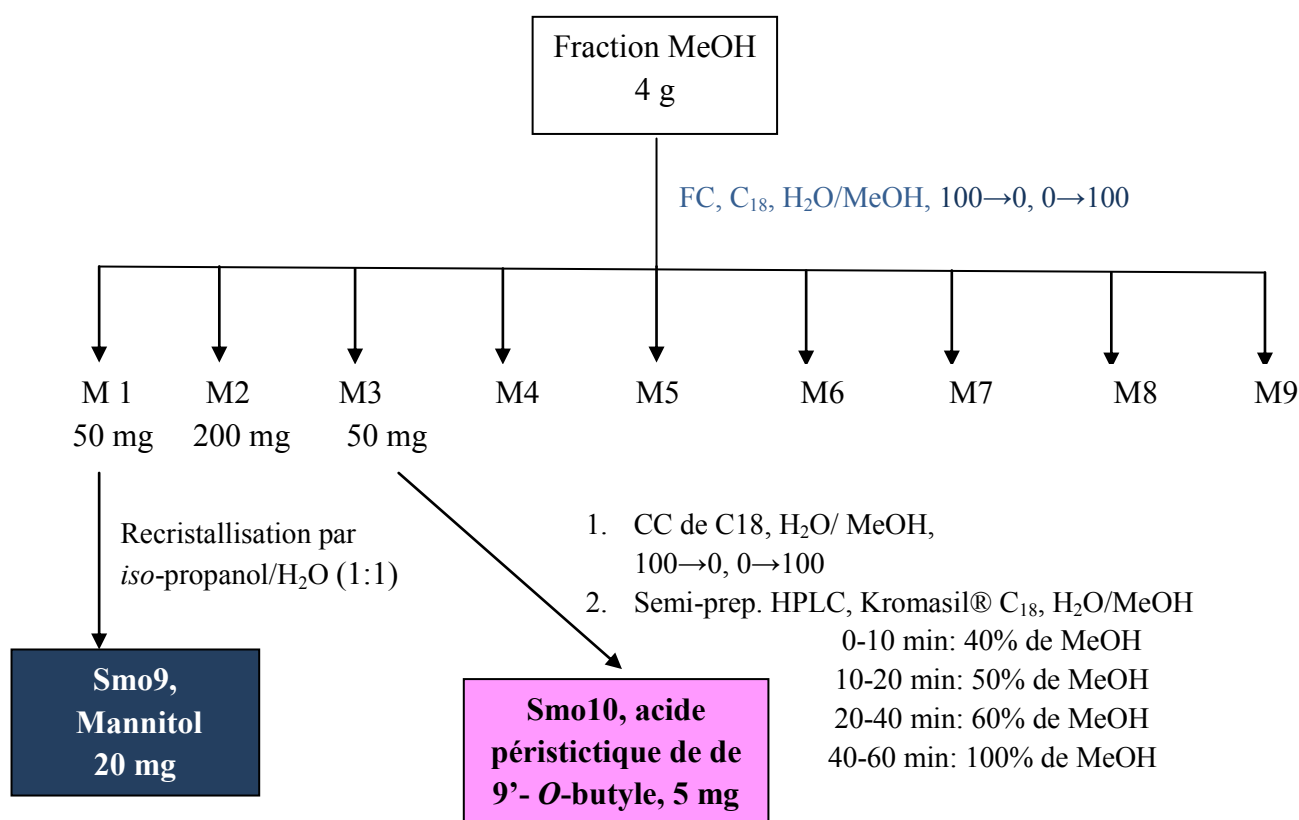


### 5.3.2 Purification de l'extrait Acétone



Le filtrat acétone (6000 mg) est purifié par une chromatographie flash sur gel de RP C18. L'élution est réalisée par un mélange ACN/H<sub>2</sub>O (100:0 à 0:100). On récolte 95 fractions de 10 mL chacune. Après réunion des fractions selon leurs profils CCM, 8 fractions sont obtenues (AI à AVIII). Le composé **Smo5** (20 mg) a été purifié à partir de subfraction AII par recristallisation dans l'éther éthylique. La fraction AIV (905 mg) a été séparée par chromatographie flash sur gel de RP-C18 (système de solvant de H<sub>2</sub>O-ACN, 100:0 à 0:100) pour obtenir 68 fractions de 10 ml. Après réunion des fractions ayant un même profil CCM, nous obtenons 6 fractions (AIV1 à AIV6) et la fraction AIV5 (65 mg) a été purifiée par HPLC semi-préparative avec colonne Kromasil® C18 en utilisant H<sub>2</sub>O et en augmentant les gradients de MeOH (60% pendant 20 min) et H<sub>2</sub>O-méthanol TFA 0,2% non-linéaire de gradient (50% pendant 20 min). Le composés **Smo6** (38 mg) et composé **Smo7** (4 mg) ont été obtenus. La fraction AV (200 mg) a été purifiée par chromatographie flash sur gel de C18 avec l'éluant H<sub>2</sub>O-ACN (100:0 à 0:100) fournir six fractions (AV1-18 à AV50W). Le composé **Smo8** (8 mg) a été obtenu par recristallisation dans l'acétate d'éthyle de la fraction AV36-39 (20 mg).

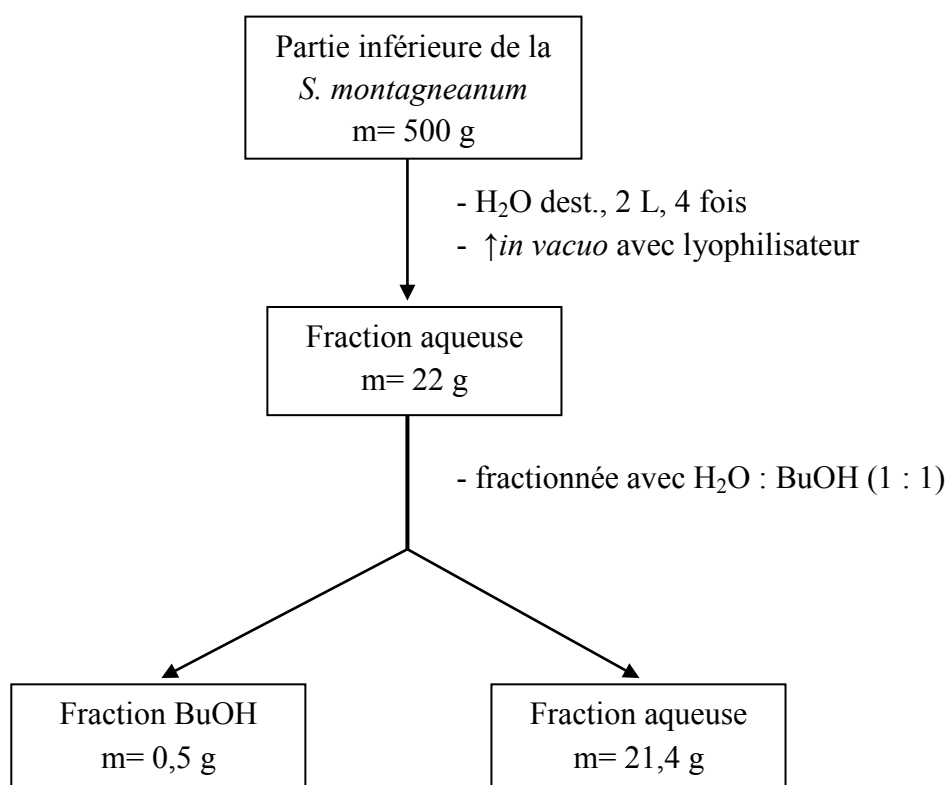
### 5.3.3 Purification de l'extrait MeOH



L'extrait méthanol (4 g) a été purifiée par l'utilisation du flash chromatographie sur colonne C18 RP avec l'éluant H<sub>2</sub>O-ACN (100:0 à 0:100) pour donner 9 fractions (M1-M9).

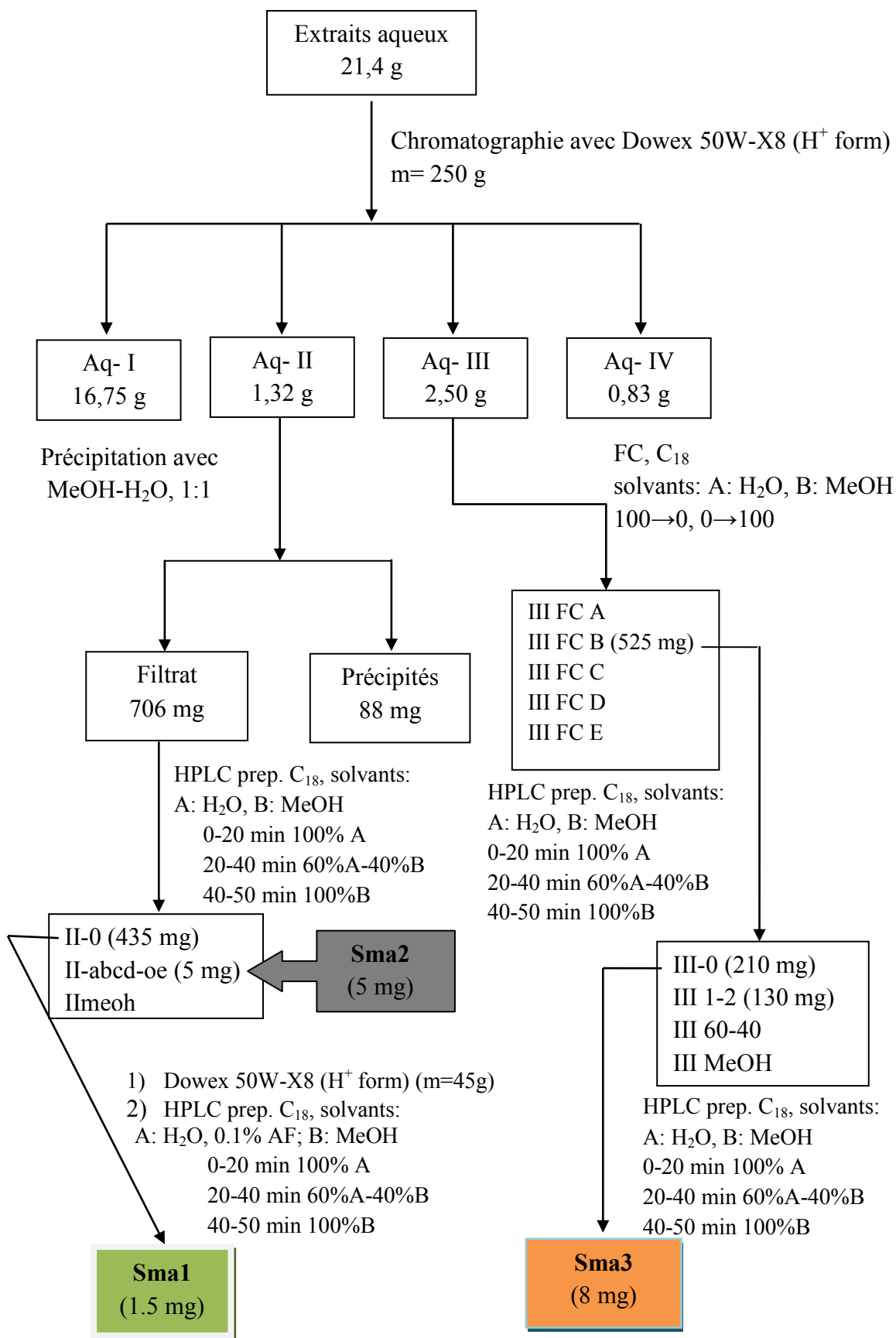
La fraction M1 a donné le composé **Smo9** (20 mg) par extraction liquide-liquide de purification avec de l'isopropanol et de l'eau (1:1). La fraction M3 (50 mg) a été séparée sur une colonne ouverte Chromabond C<sub>18</sub> (20 à 100% MeOH) et enfin purifiée par semi-préparative HPLC Kromasil ® C18, H<sub>2</sub>O-MeOH (60% pendant 20 min) pour donner le composé **Smo10** (5 mg).

#### 5.4 Purification des fractions aqueuses



Le Lichen *S. montagneanum* a été trié de ses impuretés comme la mousse, le sol, la pierre et séché à température ambiante. Le lichen (500 g) a ensuite été broyé à l'aide d'un blender et le tout est versé dans une bouteille de 3 L. On a ajouté 2 L de l'eau bidistillée froide, on bouche et on place à 4 °C pendant 3 heures et on a laissé en contact avec la matière première 2 jours sous agitation, à température 4°C. L'opération est répétée quatre fois, avec 2 L de de l'eau bidistillée. Afin de simplifier la composition de l'extrait, la fraction évaporée (22 g) a été fractionnée par H<sub>2</sub>O/BuOH (1:1) pour obtenir une fraction aqueuse (21,4 g) et une fraction BuOH, 0,5 g.





La fraction aqueuse (21.4 g) est purifiée par une chromatographie échangeuse d'ions sur gel de Dowex 50W-X8 en utilisant le protocole suivant:

250 g de résine sulfonate échangeuse de cations : DOWEX 50W-X8 (copolymère styrène + divinylbenzène, sur lequel sont greffés des groupes  $-\text{SO}_3\text{H}$ ) sont pesés, lavés abondamment (au MeOH puis à l'eau) et dégazés avant d'être coulés dans une colonne de  $50 \times 5$  cm. La résine est convertie en  $\text{H}^+$  avec de 100 ml de HCl à 1M. Puis l'excédent de HCl est éliminé de la résine avec de l'eau ultra-pure jusqu'à ce que l'effluent ait un pH supérieur à 5. L'extrait dissous dans un minimum de l'eau (21 g/800 ml) est déposé en haut de la colonne. La fraction Aq-I (16,75 g) est éluée par 800 ml d'eau (correspondant à l'élution des composés non retenus, notamment les polyols) puis par 1600 ml d'eau bidistillée (= fraction Aq-II (1,32 g)). Puis 200 ml d'une solution de NaCl à 200 mg/mL sont alors ajoutés en haut de colonne pour décrocher tous les composés retenus sur la colonne (et notamment les mycosporines et MAAs) et une fraction de 1500 ml est d'eau est ajoutée pour l'élution.

Afin d'éliminer l'excédent de NaCl se retrouvant dans la fraction purifiée, le résidu sec est repris dans 200 ml d'EtOH anhydre. Le NaCl non soluble dans l'EtOH est alors éliminé, en reprenant le surnageant. Celui-ci est alors évaporé à sec au rotavapor (= fraction Aq-III (2,50 g)). La dernière, colonne éluee avec du méthanol et la solution obtenue a été évaporée (Aq-IV (0,83 g)).

La fraction Aq-II-solution (706 mg) est séparée par HPLC préparative en utilisant une colonne C18 avec comme phase mobile de l'eau/méthanol. Cette séparation permet d'obtenir Sma2 (5 mg). La fraction II-0 (435 mg) est chromatographiée sur résine échangeuses d'ions, DOWEX 50W-X8 (45 g) en utilisant le même protocole que précédemment, puis purifié par HPLC préparative (colonne C18 avec comme phase mobile de l'eau/méthanol) et le composant Sma1 (1,5 mg) est obtenu.

La fraction Aq-III (libre-NaCl) (2,50 g) a été séparée par chromatographie flash sur gel de RP-C18 (système de solvant de  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH, 100:0 à 0:100) pour obtenir 88 fractions de 10 ml. Après réunion des fractions ayant un même profil CCM, nous obtenons 5 fractions (III FC A-E) et ensuite fraction III FC B (525 mg) a été purifiée par HPLC préparative avec une colonne C18 en utilisant  $\text{H}_2\text{O}$ /MeOH et le composant Sma3 (8 mg) est obtenu.

---

## 6 Evaluation biologique des composés isolés

### 6.1 En tant que filtre solaire

Les caractéristiques propres à un filtre solaire ont été évaluées en utilisant une méthode *in vitro* développée au laboratoire (fig.79).

#### 6.1.1 Détermination du spectre UV

#### 6.1.2 Méthode de détermination du de l'UV PF, de l'UVA PF, du ratio UV PF / UVA PF, du $\lambda_c$

##### 6.1.2.1 Préparation de l'émulsion

Une émulsion E /H est préparée par dissolution de 10 g de sulfate de lauryle dans 20 g d'eau distillée. Ensuite, sous agitation très vigoureuse, 10 g de paraffine liquide sont ajoutés et incorporés pour obtenir une émulsion.

##### 6.1.2.2 Préparation de l'échantillon et calculs

L'échantillon à tester est dissous dans du DMSO et incorporé dans l'émulsion à une concentration de 10 %. Le blanc de la solution est préparé dans les mêmes conditions (fig.76). L'absorbance ( $A_\lambda$ ) est mesurée entre 200 et 400 nm en utilisant un spectrophotomètre double faisceau et les données sont transférées dans une feuille excel. La transmittance ( $T_\lambda$ ) a ensuite été calculée à partir de l'équation 1. Les valeurs sont ensuite directement transformées en valeurs de SPF, UV-PF et UVA-PF, de longueur d'onde critique  $\lambda_c$  et du ratio UV PF/UVA PF (équations 2, 2', 3, 4). Les valeurs de SPF sont les moyennes des valeurs obtenues à partir du produit des constantes  $E_\lambda \times I_\lambda$  relatives à Mexico, Melbourne, Colipa international 2006 et Colipa UVA 2007.

$$A(\lambda)=10^{-T} \quad (1)$$

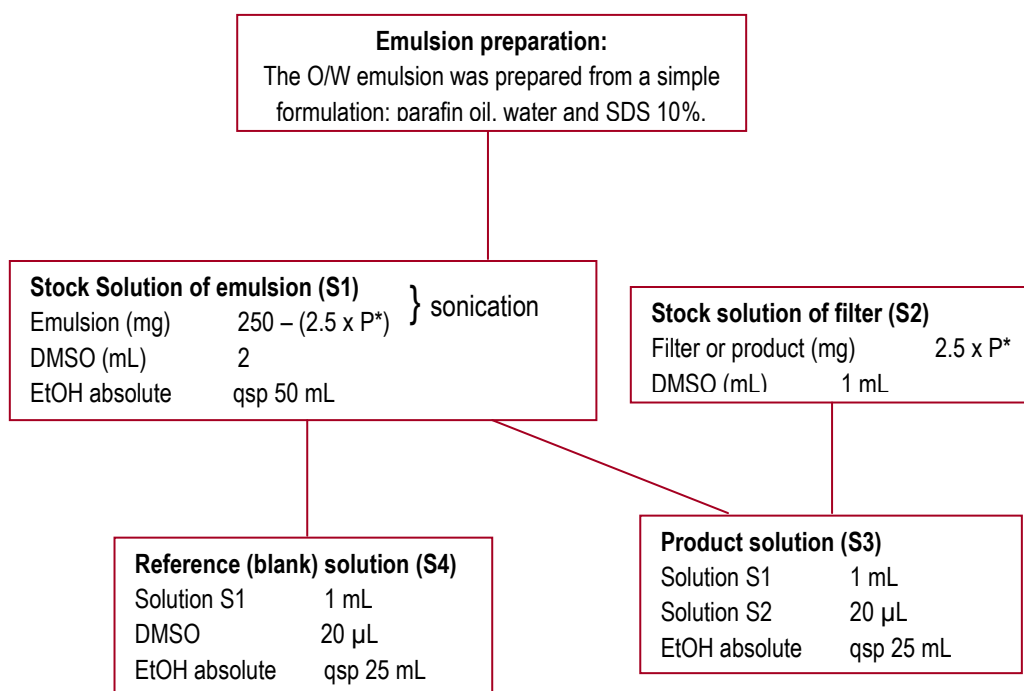
$$UV - PF = \frac{\sum_{290}^{400} E_\lambda I_\lambda \Delta_\lambda}{\sum_{290}^{400} E_\lambda I_\lambda T_\lambda \Delta_\lambda} \quad (2)$$

$$UVA-PF = \frac{\sum_{320}^{400} E_{\lambda} I_{\lambda} \Delta_{\lambda}}{\sum_{320}^{400} E_{\lambda} I_{\lambda} T_{\lambda} \Delta_{\lambda}} \quad (2')$$

$$\lambda_c = 0.9 \int_{290}^{400} A(\lambda) d\lambda \quad (3)$$

$$SUI = \frac{\sum_{290}^{380} A_{\lambda}}{\sum_{290}^{380} |A_{\lambda} - \bar{A}|} \quad (4)$$

$E_{\lambda}$  est l'irradiation spectrale du rayonnement terrestre à une longueur d'onde  $\lambda$ ,  $I_{\lambda}$  est l'action érythémale du spectre à une longueur d'onde  $\lambda$  and  $T_{\lambda}$  est la transmittance de l'échantillon à une longueur d'onde  $\lambda$ .



\*With P: percentage's value of filter in the emulsion.

**Figure 76. Schéma de préparation de la solution échantillon et du blanc pour déterminer les caractéristiques de protecteur solaire.**

## 6.2 *En tant qu'antioxydant*

### 6.2.1 *Test au DPPH*

Les produits sont mis en solution dans le DMSO à la concentration de 100 mM. Des dilutions sont effectuées pour obtenir une gamme de concentration allant de 3 mM à 111  $\mu$ M. Dans une plaque 96 puits, 10  $\mu$ L de substance à tester puis 100  $\mu$ L de DPPH sont déposés. Après 15 minutes d'incubation, la DO est mesurée à 530 nm. L'expérience est réalisée en triplicate. La concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) est calculée graphiquement à partir des moyennes des résultats obtenus. Le témoin utilisé est la vitamine C.

### 6.2.2 *Test de piégeage des anions superoxydes*

Les produits sont mis en solution dans le DMSO à la concentration de 7 mM. Des dilutions sont effectuées pour obtenir une gamme de concentration allant de 350 à 43,75  $\mu$ M. Dans une plaque 96 puits, on dépose dans chaque puits dans l'ordre suivant : NBT (50  $\mu$ M), NADH (78  $\mu$ M), 10  $\mu$ L de produit à tester aux différentes concentrations et du PMS (10  $\mu$ M). Les réactifs sont dissous dans du tampon de Tris-Hydrochloride (16 mM, pH = 8). Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 560 nm dans chacun des puits et transcrite à l'aide du logiciel BIOLISE. L'expérience est réalisée en triplicate. La concentration inhibitrice 50% (CI<sub>50</sub>) est calculée graphiquement à partir des moyennes des résultats obtenus. Le témoin utilisé est la vit.C.

### 6.3 En tant qu'agent impliqué dans la mélanogénèse

La mélanogénèse est un processus impliqué dans la synthèse de mélanine (fig. 77).

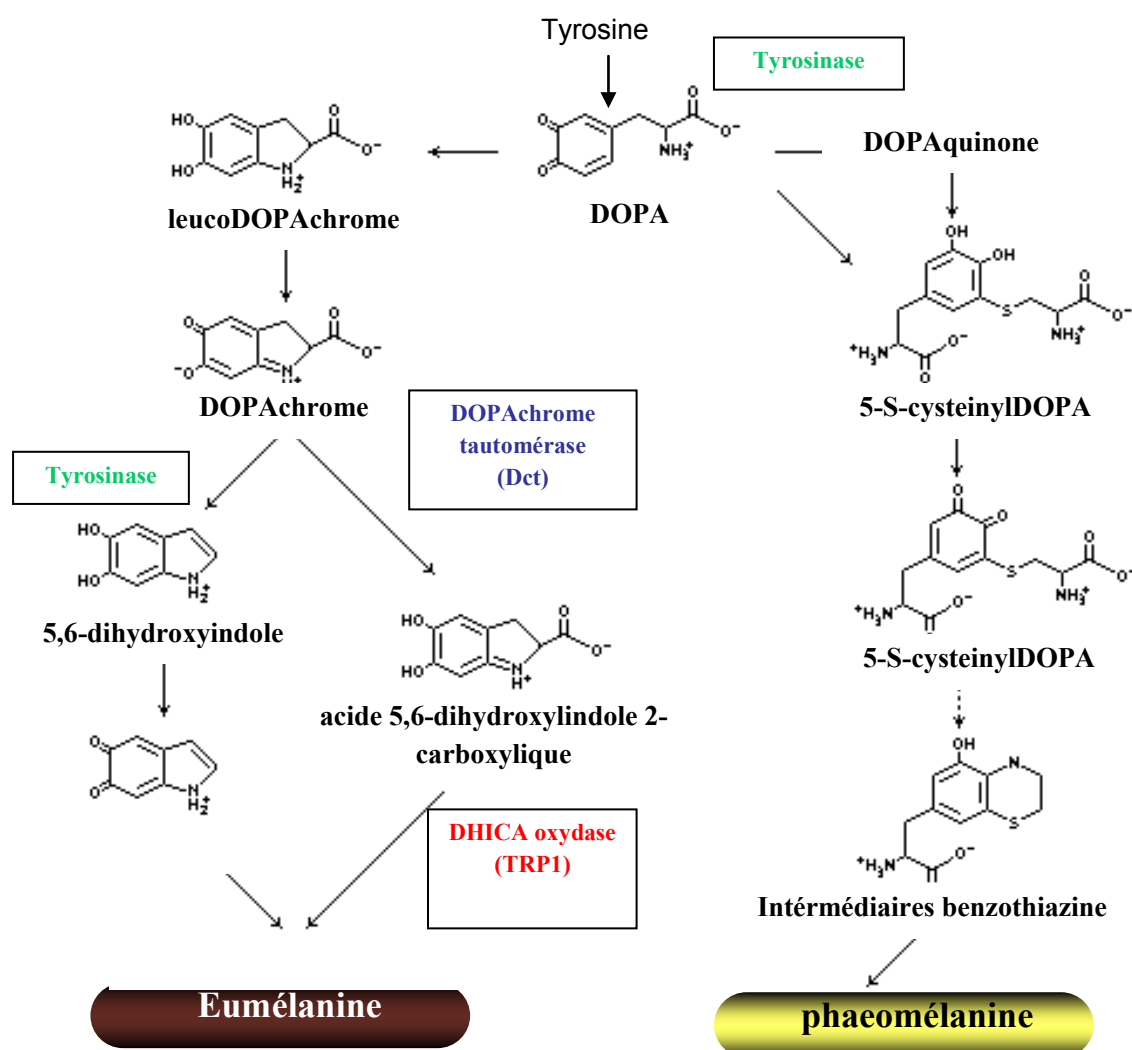


Figure 77. Voie de synthèse des mélanines

#### 6.3.1 Evaluation de la cytotoxicité des composés

Dans tous les cas, les cellules sontensemencées à un jour J0 et à une concentration permettant d'obtenir 70-80 % de confluence à la date du test (J1) et une DO suffisamment élevée pour la lecture du test. Cette concentration, selon les cellules peut-être comprise entre  $1 \times 10^3$  et  $12 \times 10^3$  cellules/puits. Cette concentration est déterminée au préalable et varie selon les lignées.

### ***HaCaT (lignée de kératinocytes de l'épiderme humain)***

Cette lignée cellulaire est utilisée pour le test d'innocuité des composés sur cellules de kératinocytes humains. Le milieu de culture de ces cellules est constitué par du DMEM additionné de 10% de SVF (Sérum de Veau Foetal) et de 1% d'un mélange de pénicilline et streptomycine. Elles sont incubées dans une étuve à 37 °C, à 5% de CO<sub>2</sub>.

### ***B16 (lignée de cellules de mélanome murin)***

Cette lignée cellulaire a été utilisée à la fois pour le test de toxicité sur 5 jours en plaques 48 puits, pour le test d'activité sur la mélanogenèse en boîtes de Pétri et pour le test de cytotoxicité sur 24 et 48 heures. Le milieu de culture de ces cellules est constitué par du RPMI 1640 additionné de 5% de SVF (Sérum de Veau Foetal) et de 1% d'un mélange de pénicilline et streptomycine. Elles sont incubées dans une étuve à 37 °C, à 10% de CO<sub>2</sub>.

Que ce soit pour l'évaluation de la toxicité à 5 jours sur cellules B16, ou à 24 et 48 heures sur cellules B16 et HaCaT, nous avons utilisé le test au MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)(Millot 2008). On prépare une solution mère de produit à tester à 50 mM dans l'eau ou le DMSO, selon la solubilité des composés, et on prépare différentes concentrations par dilutions en série dans le milieu de culture.

Des plaques 48 puits (pour la cytotoxicité sur 5 jours) ou 96 puits sontensemencées à J0 et incubées à 37 °C pendant 24 heures. A J1 (J2 et J3 pour la cytotoxicité sur 5 jours), on dépose 10 µL (20 µL pour la cytotoxicité sur 5 jours) de la solution de produit à tester. On laisse en contact, 24, 48 ou 72 heures selon le protocole, puis on mesure la viabilité cellulaire selon la méthode décrite ci-après.

Les plaques sont lavées par du PBS et centrifugées. On ajoute ensuite 10 µL (20 µL pour la cytotoxicité à 5 jours) d'une solution de MTT 5 mg/ml diluée dans le PBS. Les plaques sont incubées 3 heures à 37 °C puis centrifugées 5 minutes à 1200 tours / minute. Le surnageant est alors aspiré et dans chaque puits on ajoute 150 µL (300 µL pour la cytotoxicité à 5 jours) de DMSO jusqu'à dissolution des cristaux de formazan formés par les cellules vivantes. On agite la plaque 2 min et on lit à 690 et 540 nm au lecteur de plaque connecté au logiciel Biolise qui permet le traitement informatique des données. La cytotoxicité du composé testé est alors donnée par la formule :

$$\% \text{ de toxicité} = 100 - [((\text{DO essai} - \text{DO T milieu})/(\text{DO T cellule} - \text{DO T milieu})) \times 100]$$

$$\% \text{ de viabilité} = [((\text{DO essai} - \text{DO T milieu})/(\text{DO T cellule} - \text{DO T milieu})) \times 100]$$

Chaque essai est recommencé au minimum 3 fois, ce qui permet d'obtenir au moins 9 valeurs par concentration déposée. Pour chaque concentration, on calcule la moyenne et l'écart-type, ce qui permet de construire une courbe effet (% de cytotoxicité) en fonction de la concentration. A partir de cette courbe, on peut alors déterminer graphiquement la CI50, dose qui permet d'obtenir 50 % de cytotoxicité.

### *6.3.2 Evaluation de l'activité sur la voie de la mélanogénèse*

#### *Ensemencement des cellules*

Les cellules B16 sont ensemencées à J0, à raison de  $10^6$  cellules par boîtes de Pétri, dans un milieu de culture contenant 5% de SVF. Après 6 à 8 heures d'incubation, lorsque les cellules sont adhérentes, le milieu de culture est changé et remplacé par un milieu contenant 1% de SVF.

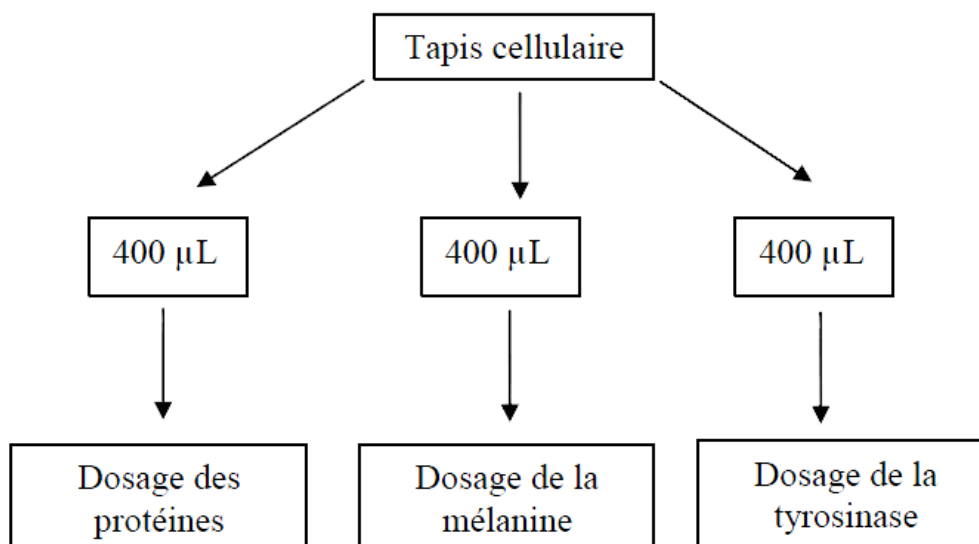
#### *Dépôt des produits*

Les produits à tester sont mis en solution dans le DMSO à une concentration qui correspond à un maximum de cytotoxicité de 10 à 15% déterminée comme précédemment. On réalise ensuite deux dilutions pour obtenir des concentrations 5 à 10 fois plus faibles. 10 µL de solution à tester est ajouté dans chaque boîte à J1, J2 et J3.

#### *Détermination de l'activité*

A J4, on réalise une première observation du tapis cellulaire au microscope afin d'observer le pourcentage de cellules mortes et vivantes. Le tapis cellulaire est ensuite rincé rapidement par 2 mL de PBS. 1mL de trypsine est ensuite ajouté dans chaque boîte de Pétri afin de décoller les cellules. La suspension cellulaire est reprise par 3 mL de milieu de culture complet et transvasée dans des tubes coniques. 40 µL de suspension sont prélevés pour réaliser le comptage cellulaire. Les tubes sont centrifugés 4 minutes à 4000 RPM. Le surnageant est jeté et les cellules sont lavées avec 2 mL de PBS. Cette opération de lavage est réalisée deux fois de suite. Les cellules sont alors reprises par 1200 µL de PBS et divisées en trois parties égales.





### *Dosage des protéines*

Les tubes sont centrifugés et le culot cellulaire repris par 250  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. Le culot est mis en suspension avant d'incuber pendant 15 minutes à 80°C. Dans une plaque 96 puits, on dépose successivement 20  $\mu\text{L}$  de lysat cellulaire (20  $\mu\text{L}$  de solution de NaOH 1M pour le blanc), 10  $\mu\text{L}$  de réactif A et 10  $\mu\text{L}$  de réactif B. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la quantité de protéine contenue dans les lysats est mesurée au spectrophotomètre à 620 nm.

### *Dosage de la mélanine*

Dans une plaque 96 puits, on dépose 200  $\mu\text{L}$  de lysat cellulaire (200  $\mu\text{L}$  de solution de NaOH 1M pour le blanc). La quantité de mélanine contenue dans les lysats est mesurée au spectrophotomètre à 405 nm. La quantité de mélanine est exprimée en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de protéines rapportée au nombre de cellules présentes dans les 500  $\mu\text{L}$  prélevés.

### *Dosage de la tyrosinase*

Cette activité est mesurée par le dosage colorimétrique de la dopaquinone, formée par transformation de la L-DOPA par la tyrosinase. Les tubes sont centrifugés et le culot de cellule est repris par 1mL de tampon de lyse. 1mL de L-DOPA à 10 mM sont ajoutés et les solutions sont mises à incuber à 37°C pendant 30 minutes. Dans une plaque 96 puits, on dépose 200  $\mu\text{L}$  de solution. La DO est mesuré au spectrophotomètre à 450 nm. L'activité de la tyrosinase s'exprime par le rapport entre la DO mesurée et le nombre de cellules présentes dans les 500  $\mu\text{L}$  prélevés.

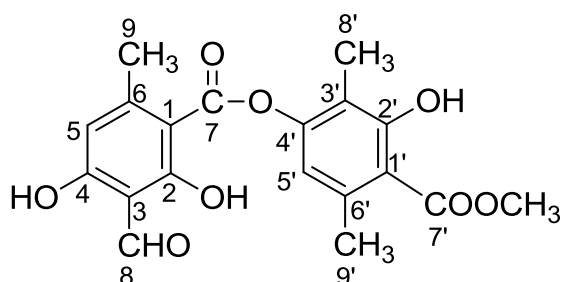
Le contrôle est constitué de cellules additionnées de DMSO dilué au 1/1000ème dans le milieu de culture cellulaire afin de se placer dans les mêmes conditions que le dépôt des produits. La concentration de DMSO est dans ce cas inférieure à la dose toxique du DMSO et sans effet sur la l'activité enzymatique cellulaire.



## 7 Description des molécules isolées

### Atranorine

Structure



Sources: *S. halei* Lamb.; *S. montagneanum* Lamb

Aspect: poudre blanche

CCM; Rf= 0,87 (toluène/AcOEt/AF 139 :83 :8 (G)), Rf= 0,76 (*n*-hexane/EE/AF 130:80:8 (B)).

Point de fusion: 196-197°C

MS: HRESIMS  $m/z$  397.0900  $[M+Na]^+$  (calcd. for  $C_{19}H_{18}O_8Na$ , 397.0899)

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 269 (4.88)

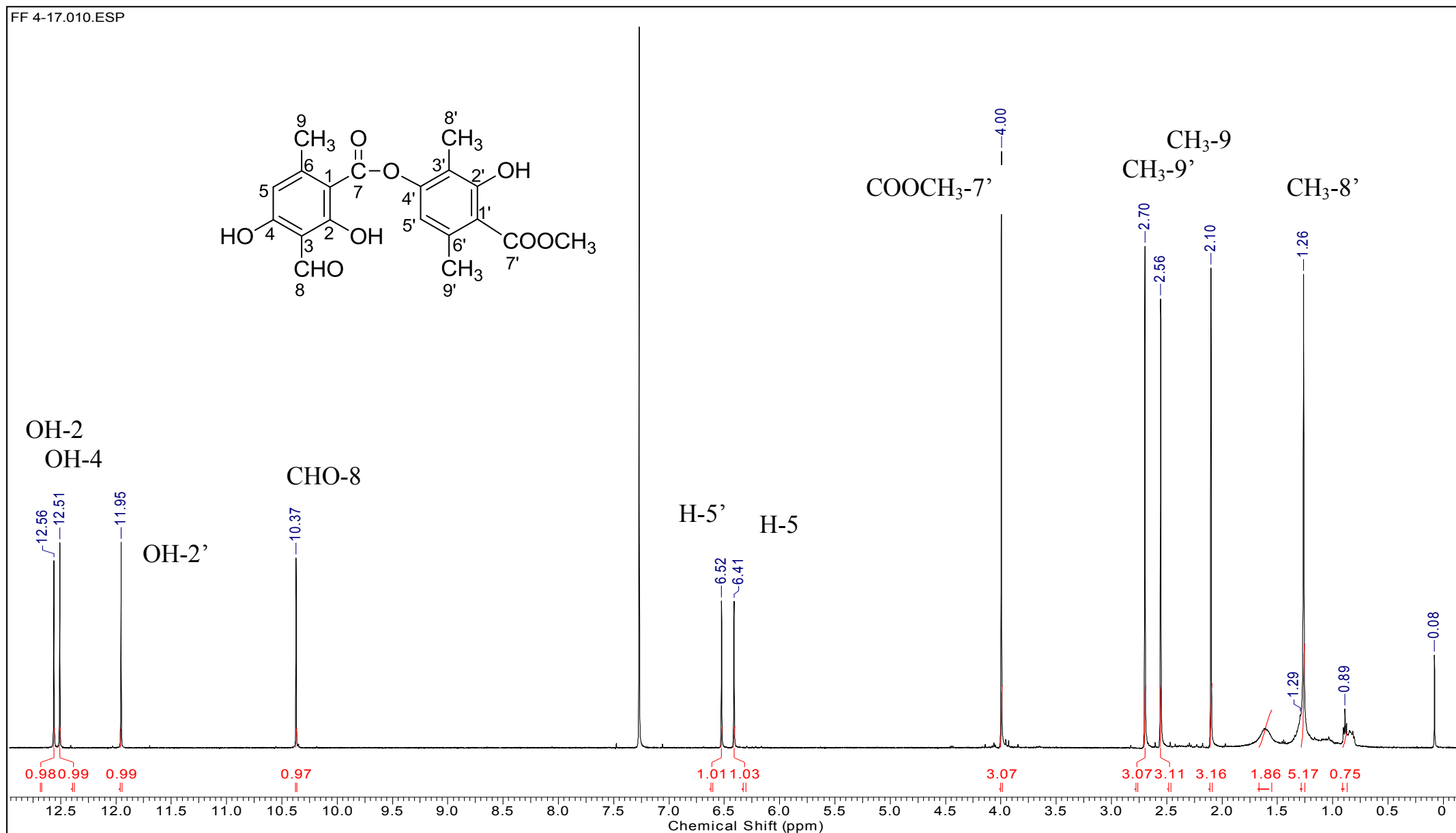
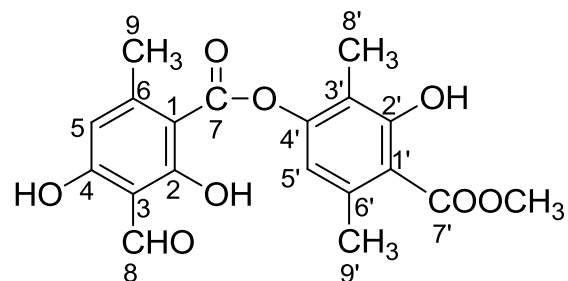
FTIR (acétone)  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ) : 3645; 2955 (OH phénolique), 1651 (CO- ester)

$^1H$ ,  $^{13}C$  RMN;

Position	Atranorin (500 MHz, $CDCl_3$ )	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (int., mult. $J(Hz)$ )
1	102.92	-
OH-2	169.17	12.56
3	108.63	-
OH-4	167.57	12.51
5	112.93	6.41
6	152.51	-
7	169.77	-
CHO-8	193.92	10.37
CH <sub>3</sub> -9	25.67	2.56
1'	116.86	-
2'	162.95	-
3'	110.34	-
4'	152.06	-
5'	116.09	6.52
6'	139.94	-
7'	172.27	-
CH <sub>3</sub> -8'	24.12	2.10
CH <sub>3</sub> -9'	9.46	2.70
OCH <sub>3</sub> -7'	52.42	4.00

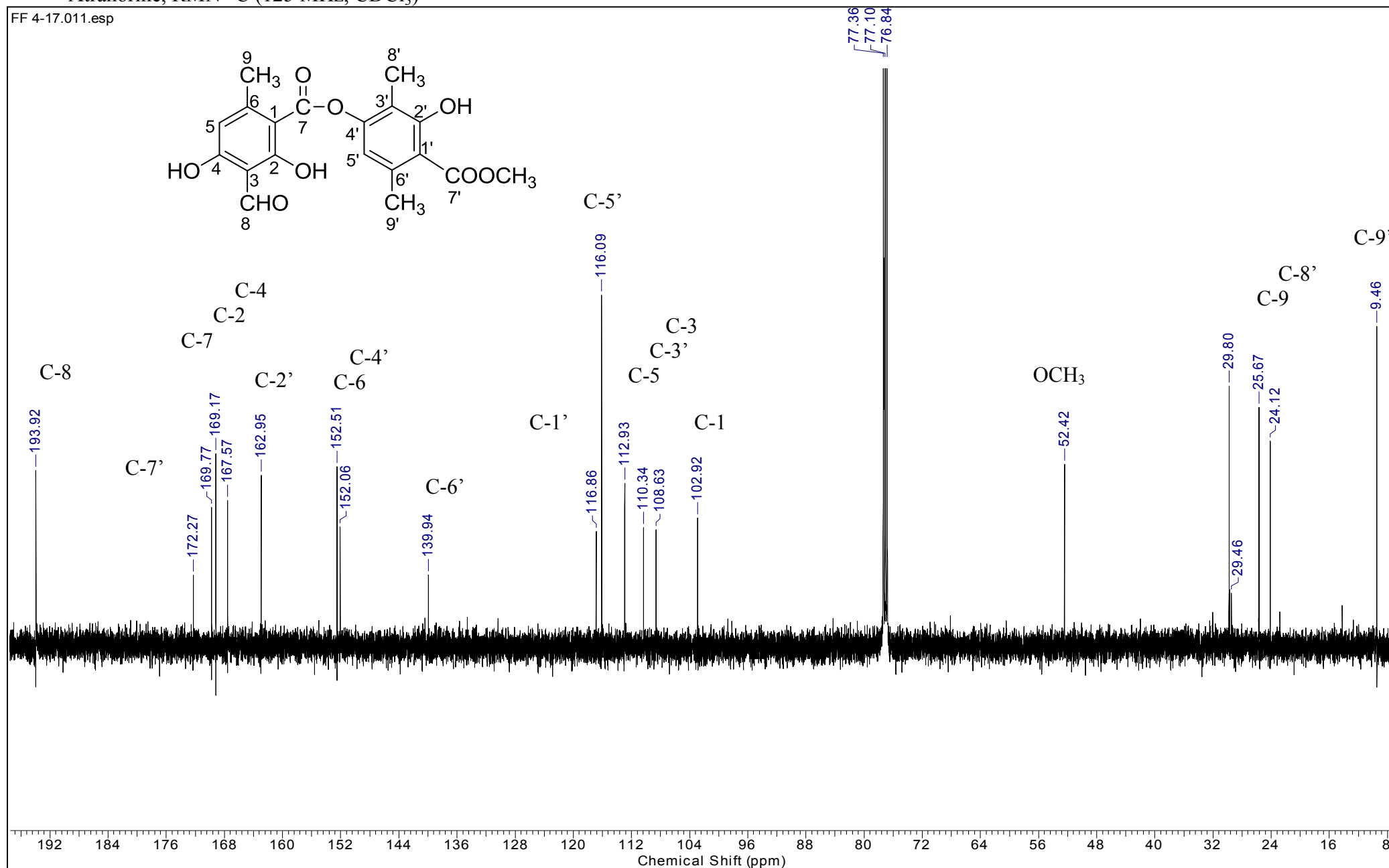
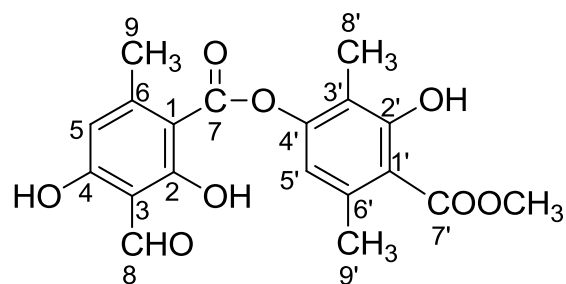
Atranorine, RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

FF 4-17.010.ESP



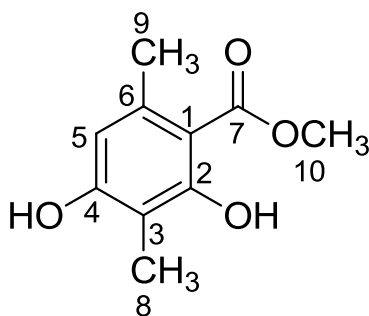
Atranorine, RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

FF 4-17.011.esp



# Orcinol carboxylate de méthyle (MOC)

Structure



Sources: *S.halei* Lamb.; *S. montagneanum* Lamb

Aspect: cristalline blanche (CHCl<sub>3</sub>)

CCM; R<sub>f</sub>= 0,48 (G), R<sub>f</sub>= 0,70 (B).

Point de fusion: 140-141°C

MS: HRESIMS  $m/z$  197.0816 [M+H]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>O<sub>4</sub>, 197.0814)

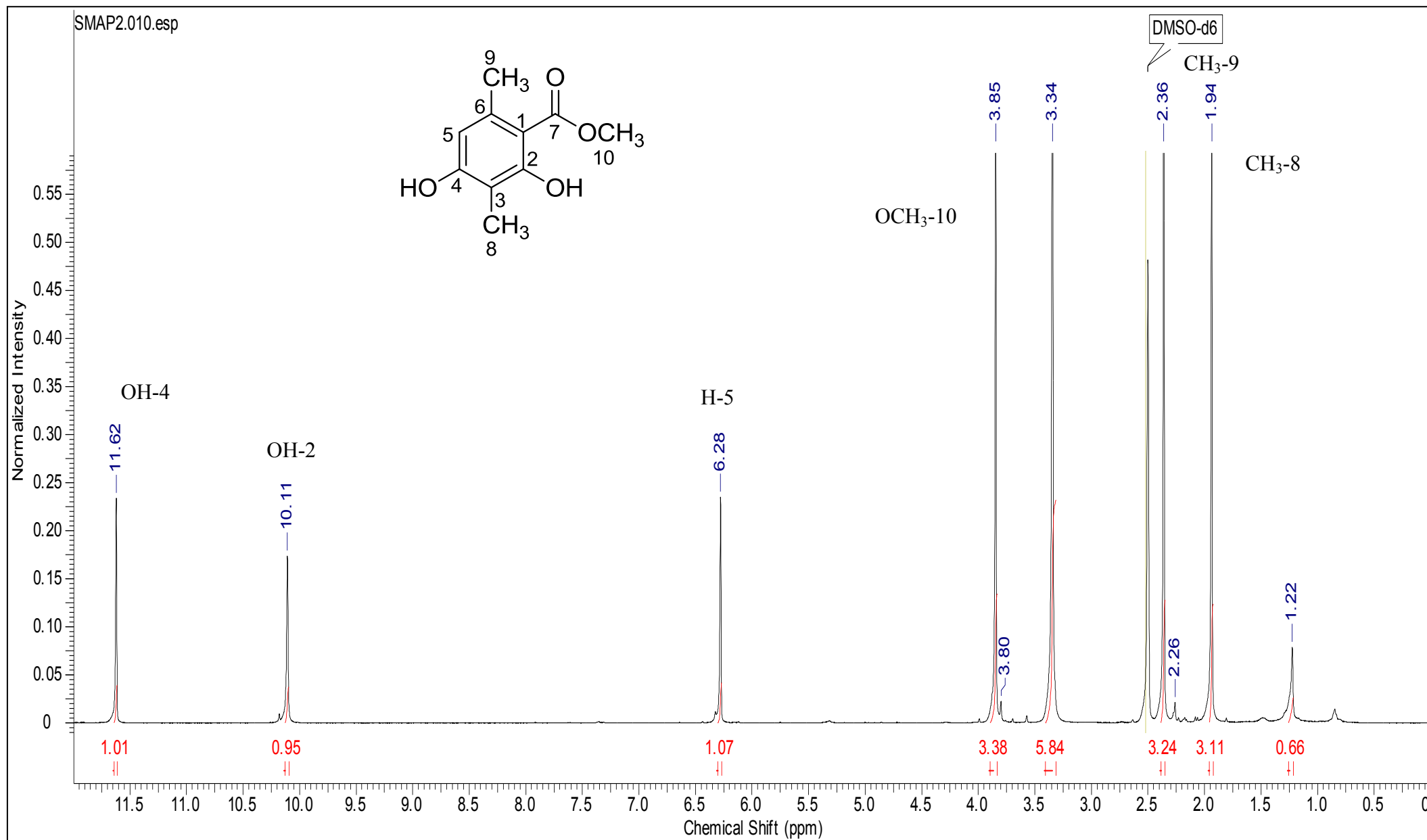
UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 215 (4.52); 267 (4.30); 300 (0.77)

FTIR (THF)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>) : 3399; 3080 (OH phénolique), 1731 (CO- cétonique)

<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN;

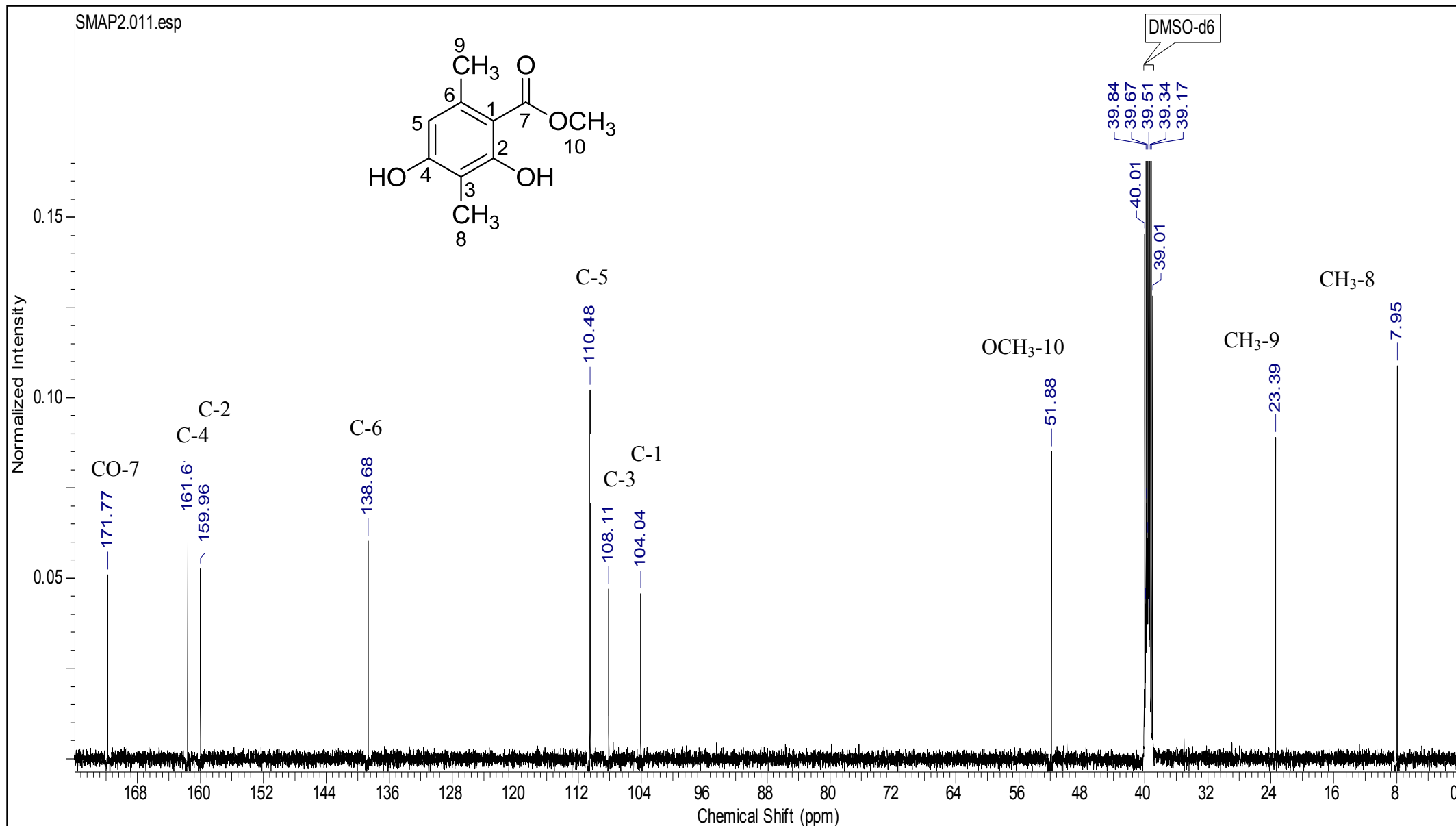
Position	Orcinol carboxylate de methyle (MOC) (500 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (int., mult. <i>J</i> (Hz))
1	104.04	-
OH-2	159.96	10.11(1H, s)
3	108.11	-
OH-4	161.61	11.62 (1H, s)
5	110.48	6.28 (1H, s)
6	138.68	-
CO-7	171.77	-
CH <sub>3</sub> -8	7.95	1.94 (3H, s)
CH <sub>3</sub> -9	23.39	2.36 (3H, s)
OCH <sub>3</sub> -10	51.88	3.85 (3H, s)

MOC, RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{DMSO}-d_6$ )



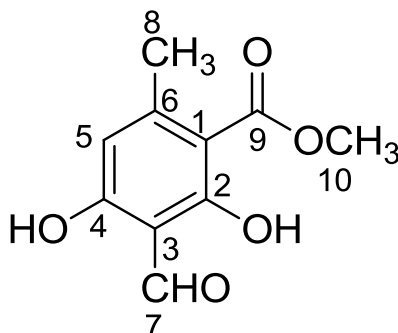


MOC, RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz;  $\text{DMSO-}d_6$ )



## Haematommate de méthyle

Structure



Sources: *S. halei* Lamb.; *S. montagneanum* Lamb

Aspect: cristalline blanche (CHCl<sub>3</sub>)

CCM; R<sub>f</sub> = 0,82 (B), R<sub>f</sub> = 0,31 (*n*-hexane/AcOEt 95:5).

Point de fusion: 146-147°C

MS: HRESIMS  $m/z$  233.0430 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>Na, 233.0426),  $m/z$  255.0253 [M-H+2Na]<sup>+</sup>,  $m/z$  201.0171 [M-CH<sub>3</sub>OH+2Na]<sup>+</sup>

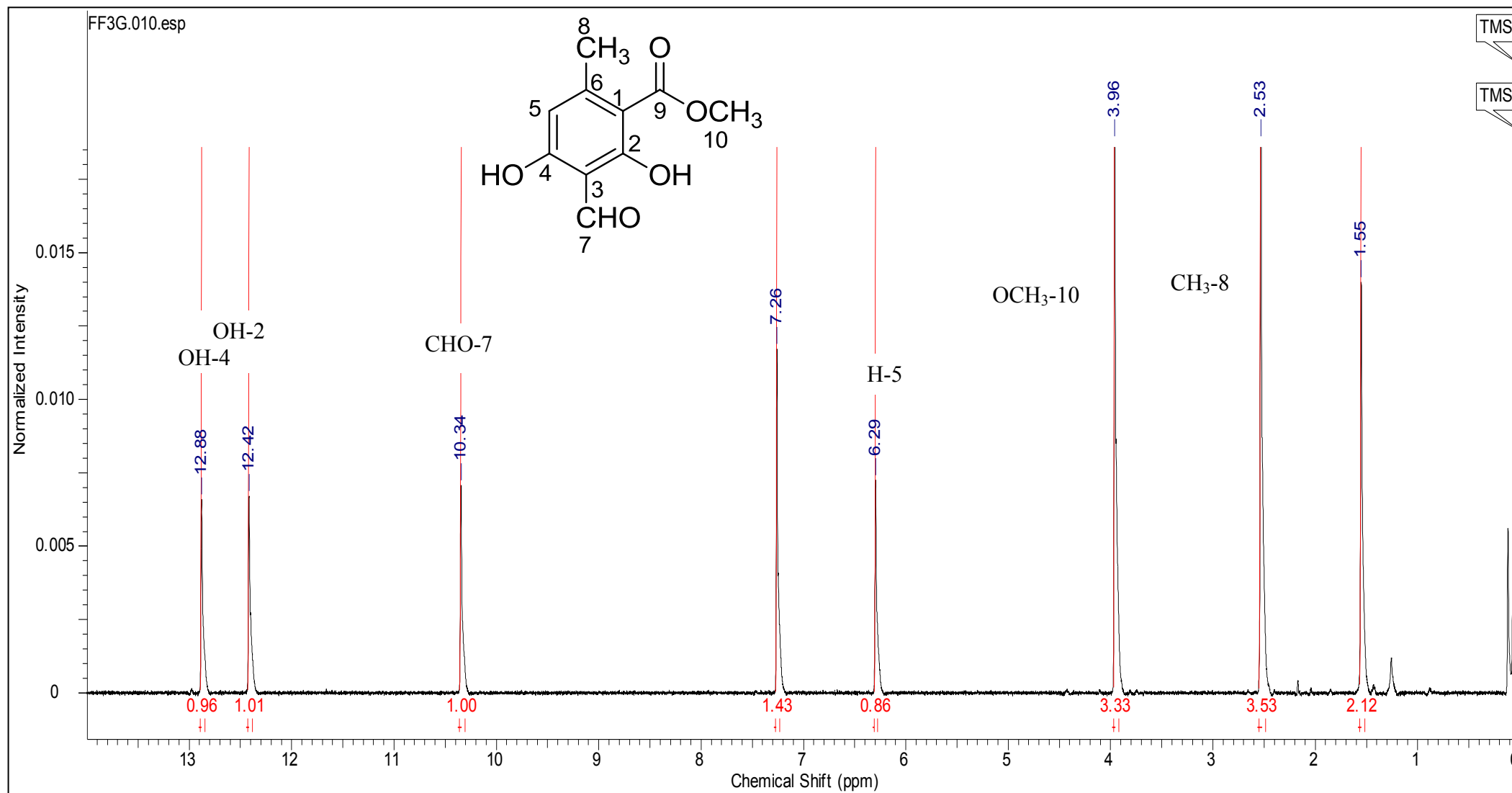
UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 241 (3.96); 261 (2.88); 276 (3.84); 338 (2.52)

FTIR (THF)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 2954, 2952 (OH phénolique), 1643 (CO- ester)

<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN;

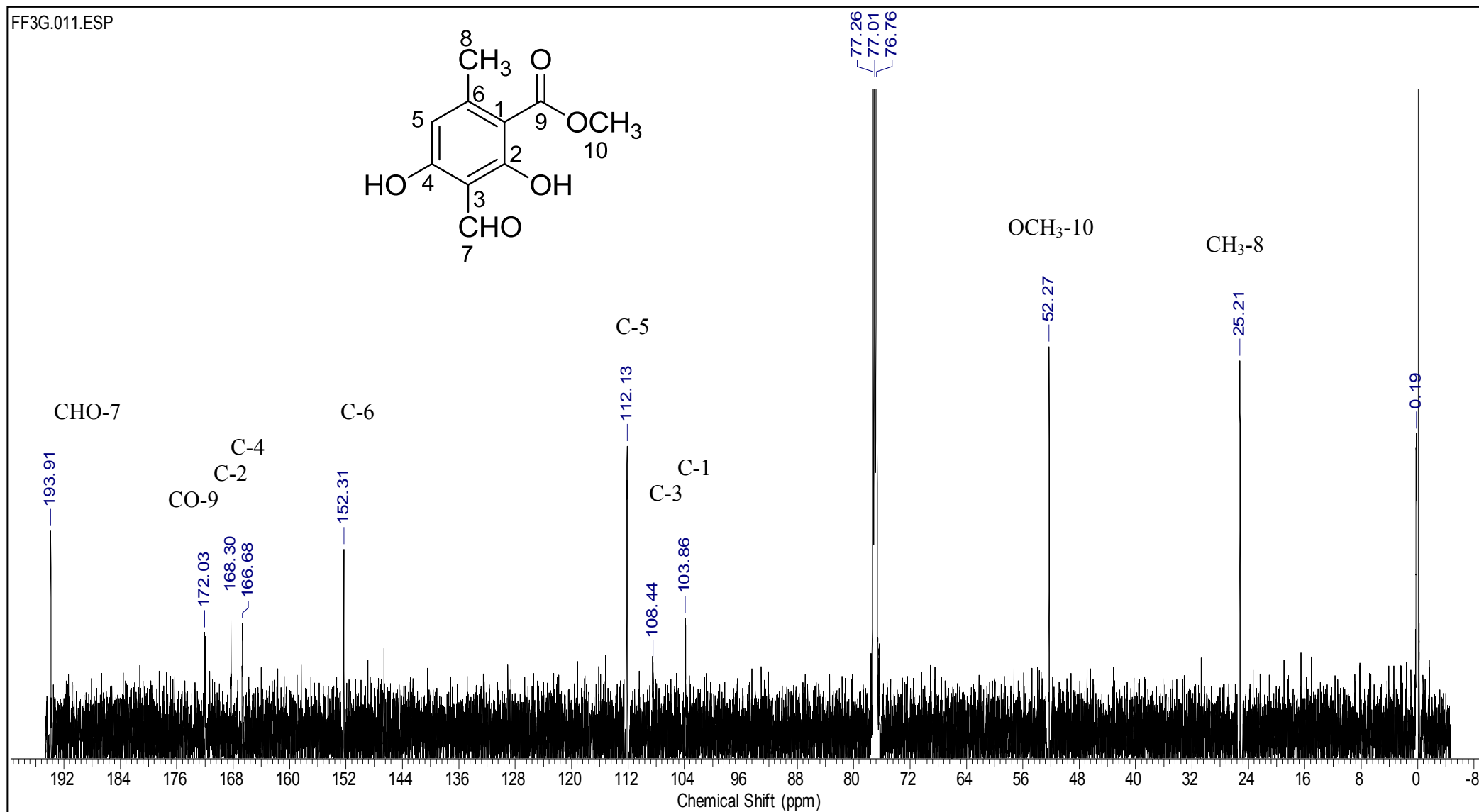
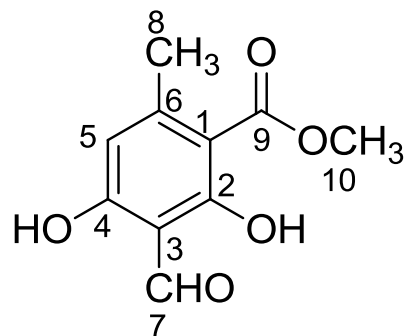
Position	haematommate de methyle (500 MHz; CDCl <sub>3</sub> )	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (int., mult. $J$ (Hz))
1	103.86	-
OH-2	168.30	12.42 (1H, s)
3	108.44	-
OH-4	166.68	12.88 (1H, s)
5	112.13	6.29 (1H, s)
6	152.31	-
CHO-7	193.91	10.34 (1H, s)
CH <sub>3</sub> -8	25.21	2.53 (3H, s)
CO-9	172.03	-
OCH <sub>3</sub> -10	52.27	3.96 (3H, s)

Haematommate de methyle, RMN<sup>1</sup>H (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>)



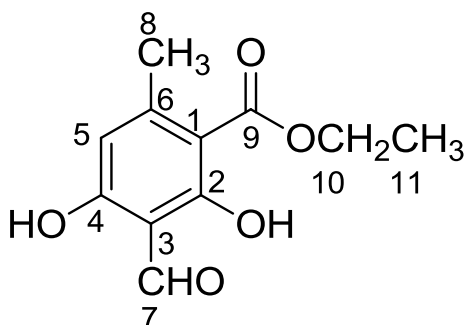
Haematommate de methyle, RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )

FF3G.011.ESP



## Haematommate d'éthyle

Structure



Sources: *S.halei* Lamb.; *S. montagneanum* Lamb

Aspect: cristalline blanche (CHCl<sub>3</sub>)

CCM; R<sub>f</sub> = 0,82 (B), R<sub>f</sub> = 0,36 (*n*-hexane/AcOEt 95:5).

Point de fusion: 113-114°C

MS: HRESIMS *m/z* 247.0581 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>Na, 247.0582)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 242 (4.41); 261 (4.06); 289 (3.76); 339 (3.51)

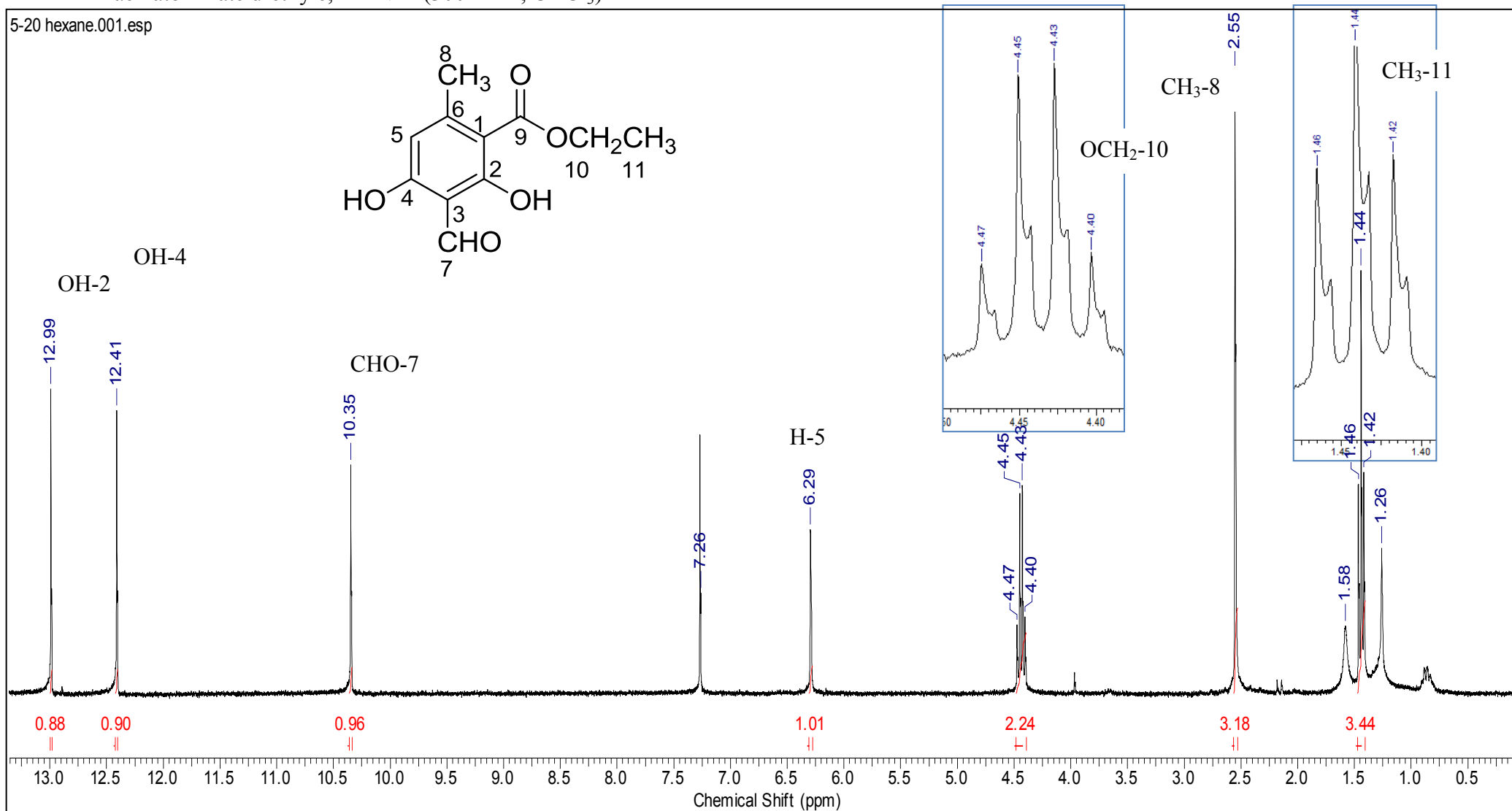
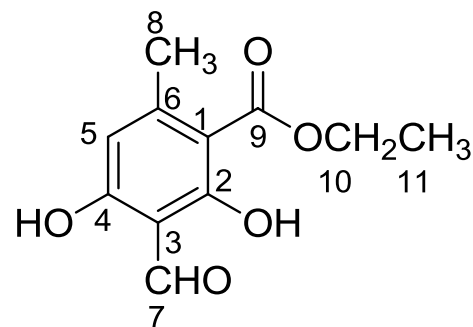
FTIR (THF) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>): 2955 (OH phénolique), 1646 (CO- ester)

<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN;

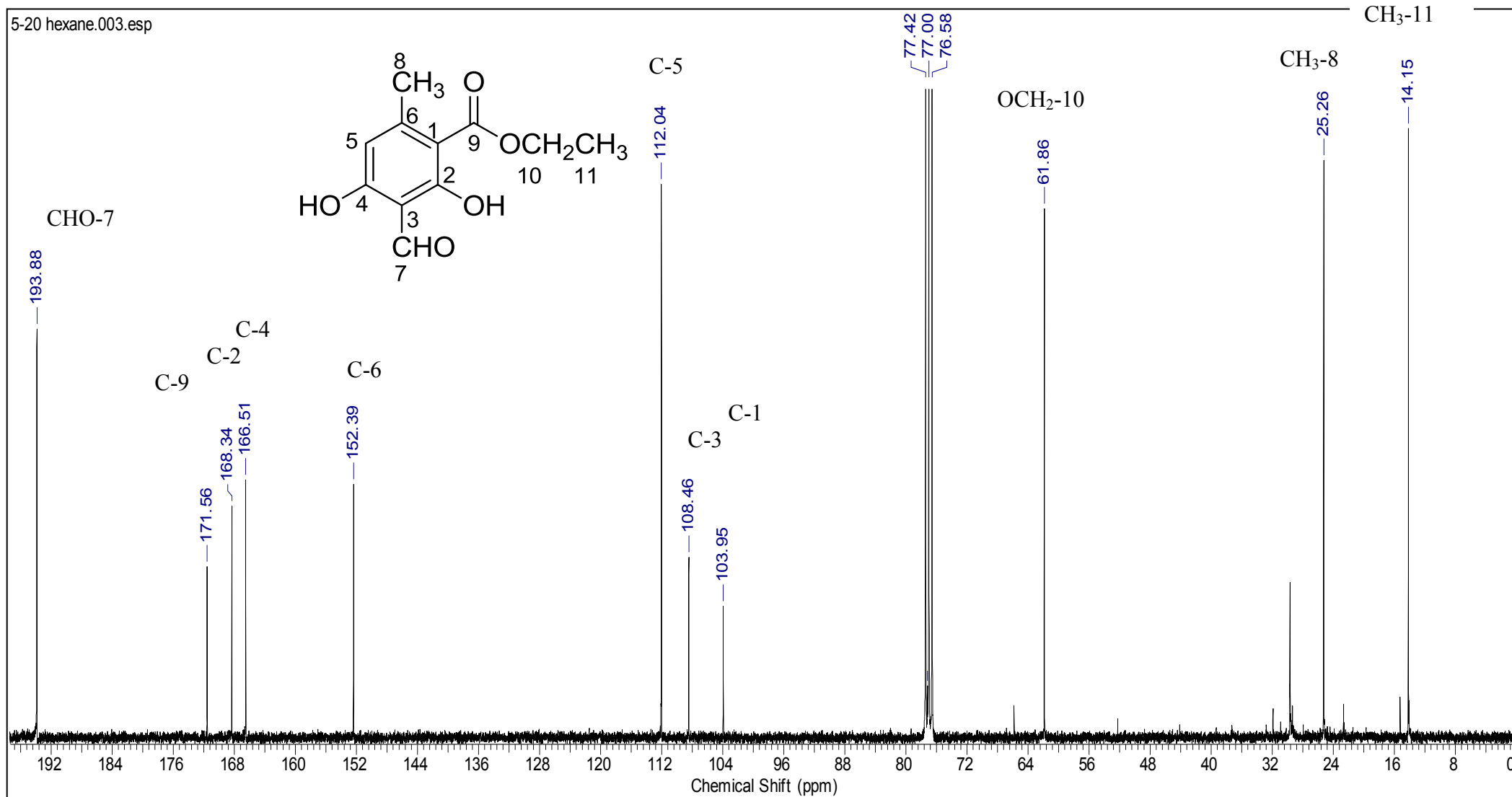
Position	haematommate d'éthyle (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> )	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (int., mult. <i>J</i> (Hz))
1	103.95	-
OH-2	168.34	12.99 (1H, s)
3	108.46	-
OH-4	166.51	12.41 (1H, s)
5	112.04	6.29 (1H, s)
6	152.39	-
CHO-7	193.88	10.35 (1H, s)
CH <sub>3</sub> -8	25.26	2.55 (3H, s)
CO-9	171.56	-
OCH <sub>2</sub> -10	61.86	4.45 (2H, q, <i>J</i> = 7.10)
CH <sub>3</sub> -11	14.15	1.44 (3H, t, <i>J</i> = 7.06)

Haematommate d'ethyle, RMN<sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>)

5-20 hexane.001.esp

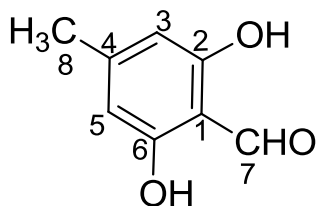


Haematommate d'ethyle, RMN<sup>13</sup>C (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>)



## Atranol

Structure



Sources: *S. montagneanum* Lamb

Aspect: cristalline jaune (CHCl<sub>3</sub>)

CCM; R<sub>f</sub> = 0,4 (B),

Point de fusion: 113-114°C

MS: HRESIMS  $m/z$  247.0581 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>Na, 247.0582)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 242 (4.41); 261 (4.06); 289 (3.76); 339 (3.51)

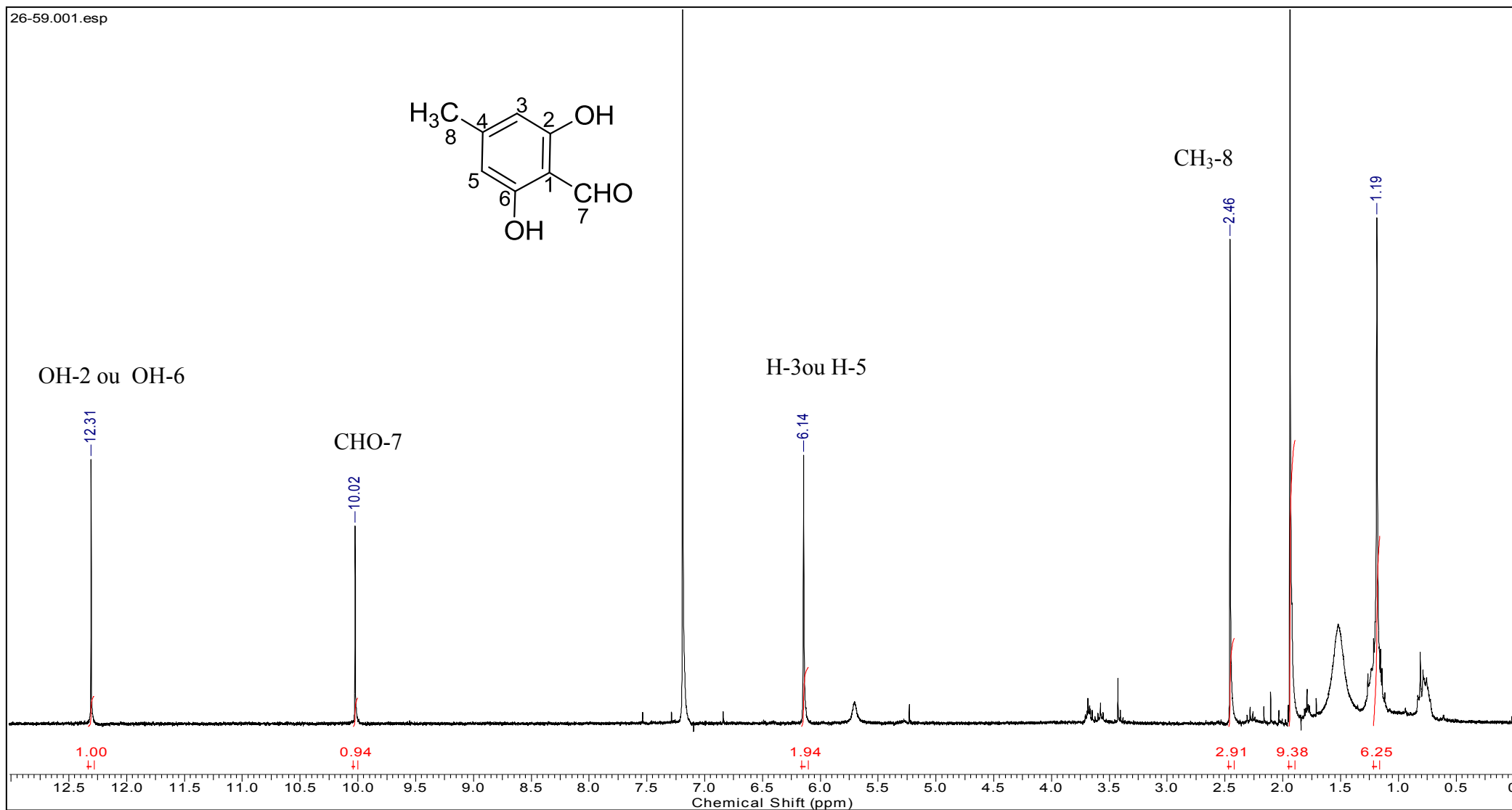
FTIR (THF)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>) : 2955 (OH phénolique), 1646 (CO- ester)

<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C RMN;

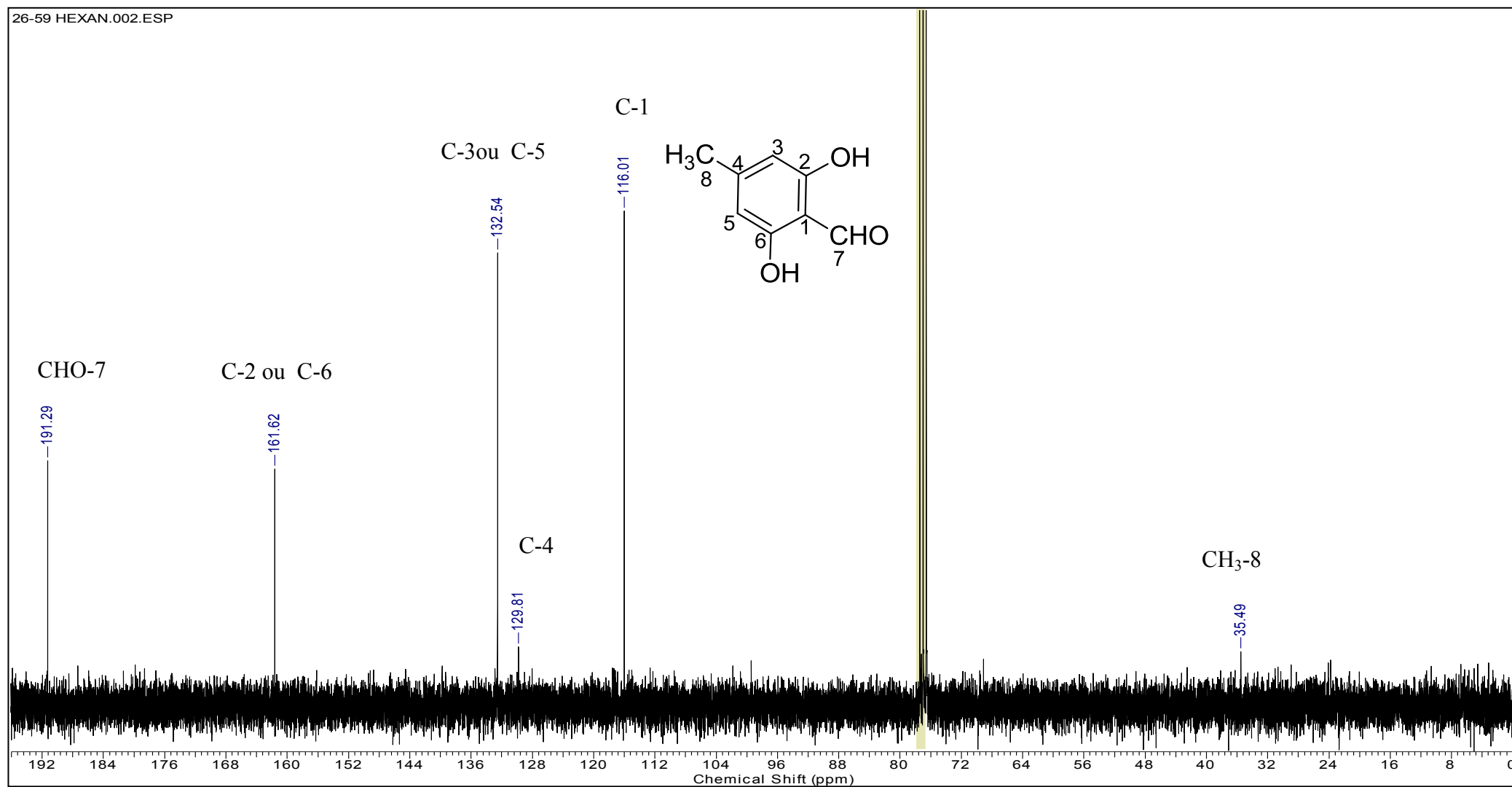
Position	Atranol (300 MHz; CDCl <sub>3</sub> )	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (int., mult. $J$ (Hz))
1	116.01	-
OH-2	161.62	12.31 (1H, s)
3	132.54	6.14 (2H, s)
4	129.81	-
5	132.54	6.14 (2H, s)
OH-6	161.62	12.31 (1H, s)
CHO-7	191.29	10.02 (1H, s)
CH <sub>3</sub> -8	35.49	2.46 (3H, s)



Atranol, RMN<sup>1</sup>H (300 MHz; CDCl<sub>3</sub>)

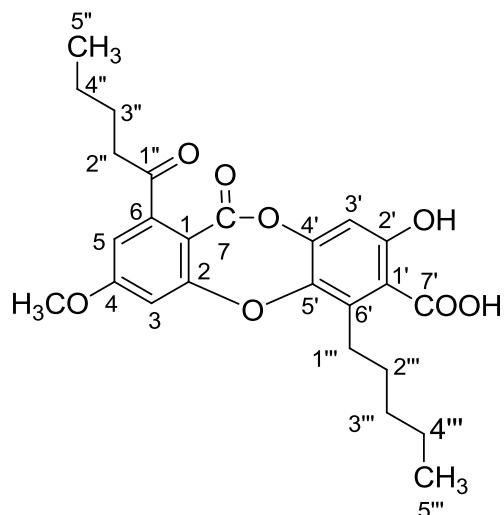


Atranol, RMN<sup>13</sup>C (75 MHz; CDCl<sub>3</sub>)



# Acide lobarique

Structure



Sources: *S. halei* Lamb.

Aspect: cristalline blanche (CHCl<sub>3</sub>)

CCM; R<sub>f</sub>= 0,46 (B), R<sub>f</sub>= 0,56 (G).

Point de fusion: 196-197°C

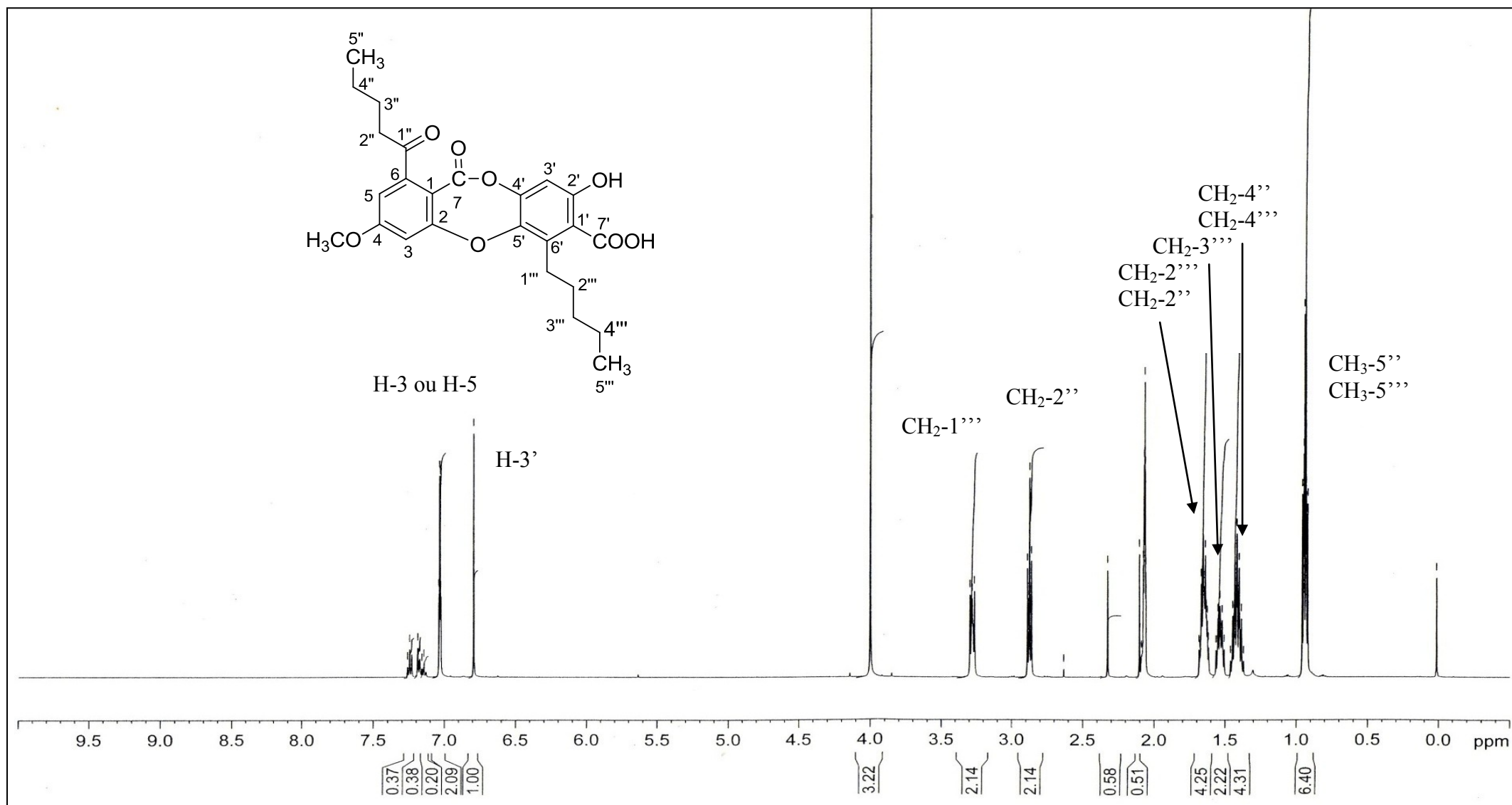
MS: HRESIMS *m/z* 455.1715 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>O<sub>8</sub>, 455.1715)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 211(4.03), 266(3.20), 299(3.19)

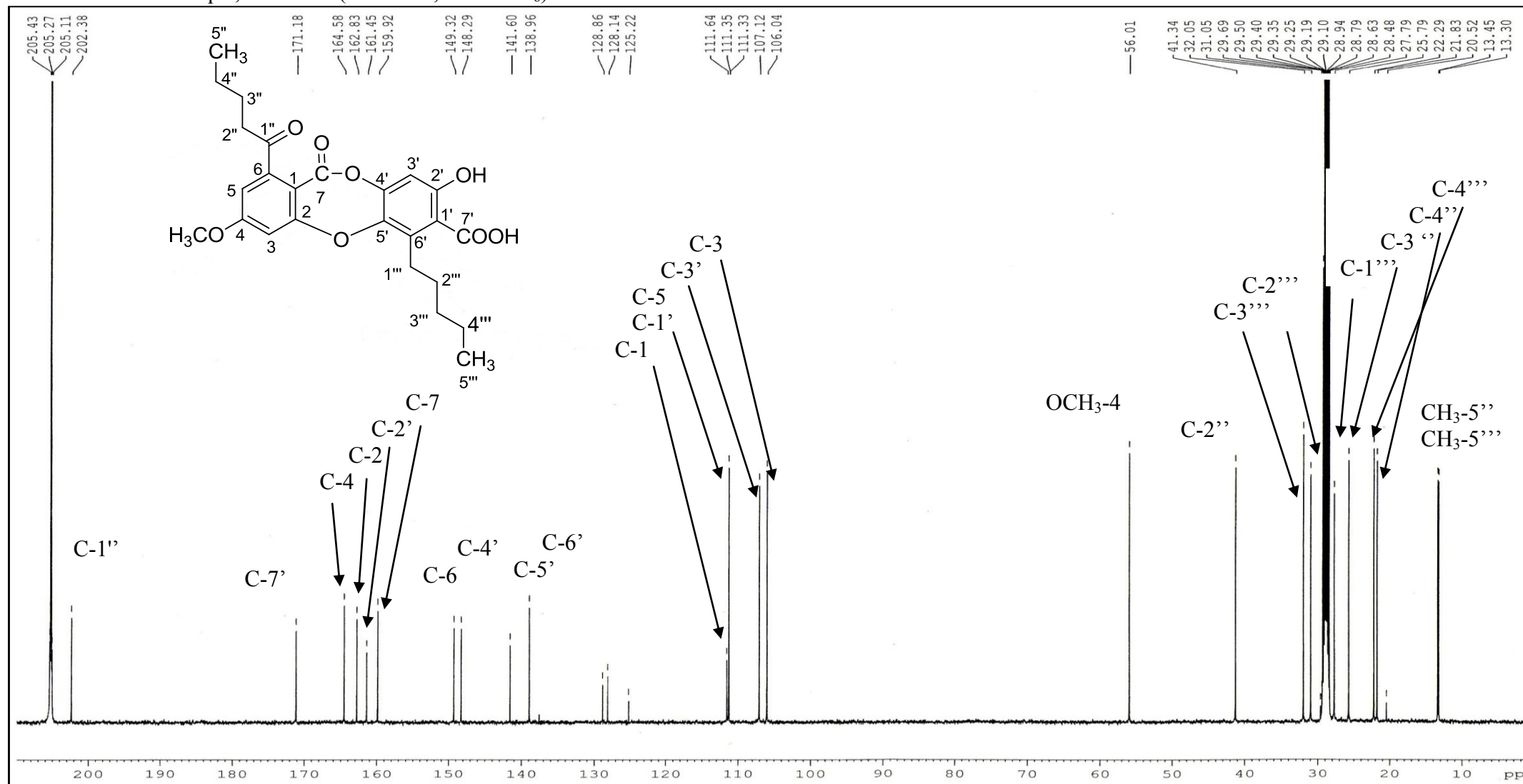
FTIR (acetone) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>): 2957 (OH phénolique), 1731 (CO cétonique), 1646 (CO- ester)

Position	acide lobarique (500 MHz, acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> )		HMBC	COSY
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)		
1	111.64	-	-	-
2	162,83	-	-	-
3	106.04	7.03, dd, ( <i>J</i> = 2.4, 2.5)	2, 4, 5	-
4	164.58	-	-	-
5	111.33	7.03, dd, ( <i>J</i> = 2.4, 2.5)	3	-
6	149.32	-	-	-
7	161.45	-	-	-
1''	202.38	-	-	-
2''	41.34	2.88, t ( <i>J</i> =7.25)	1'', 3''	3''
3''	25.79	1.68, m	1'', 2'', 5''	2'', 4''
4''	22.29	1.43, m	2'', 3'', 5''	3'', 5''
5''	13.30	0.95, m	3'', 4''	4''
1'	111.35	-	-	-
2'	159.92	-	-	-
3'	107.12	6.79, s	1', 2', 4', 5', 7'	-
4'	148.29	-	-	-
5'	141.60	-	-	-
6'	138.96	-	-	-
7'	171.18	-	-	-
1'''	27.79	3.29, t ( <i>J</i> =1.00)	-	2'''
2'''	31.00	1.68, m	1''', 4'''	1''', 3''', 4'''
3'''	32.00	1.55, m	1''', 2''', 5'''	2''', 4'''
4'''	21.83	1.43, m	2''', 5'''	2''', 3''', 5'''
5'''	13.45	0.95, m	4'''	4'''
OCH <sub>3</sub> -4	56.01	3.99, s	4	-

Acide lobarique, RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acetone- $d_6$ )

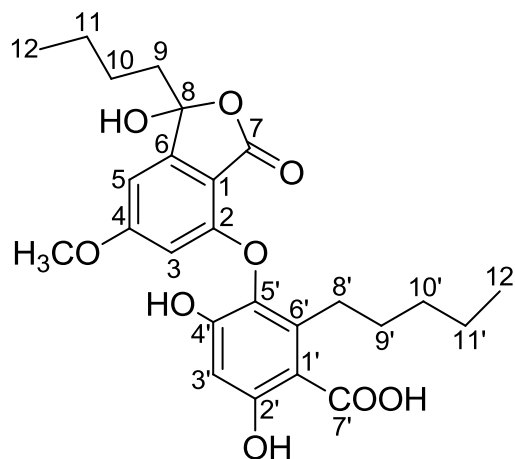


Acide lobarique, RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, acetone- $d_6$ )



### Acide lobariol carboxylique

Structure



Sources: *S. halei* Lamb.

Aspect: brune solide amorphe

CCM; Rf= 0,175 (C), Rf= 0,44 (G).

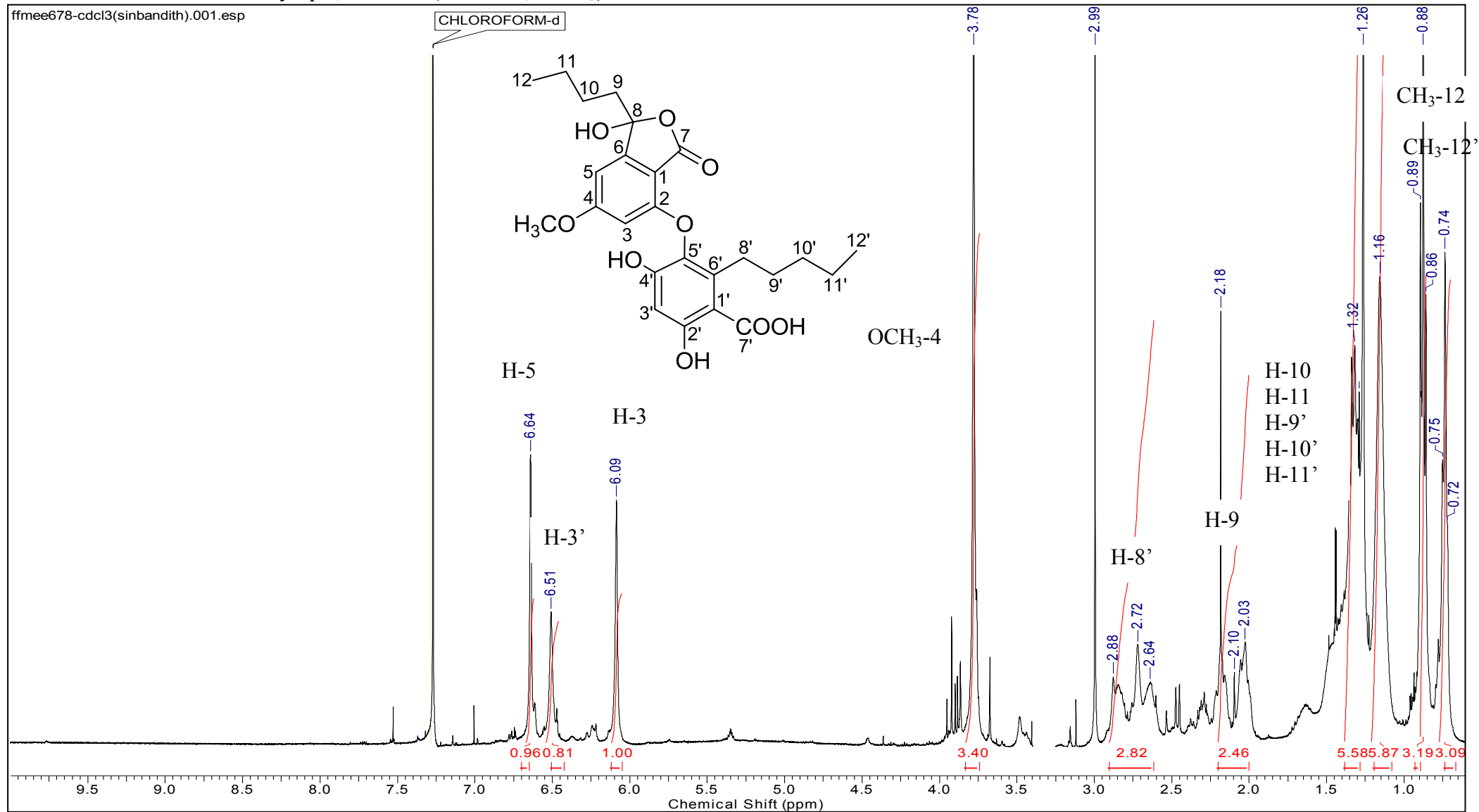
MS: HRESIMS  $m/z$  473.1817  $[M-H]^-$  (calcd. for  $C_{25}H_{29}O_9$ , 473.1817),  $m/z$  495.1638  $[M-2H+Na]^+$

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 213 (3.74), 252 (3.41) and 295 (3.11) nm

IR (KBr)  $\nu_{max}$  3350, 2955 (OH, phenolique), 1736 (CO, cétonique), 1614  $cm^{-1}$  (CO, carboxylique)

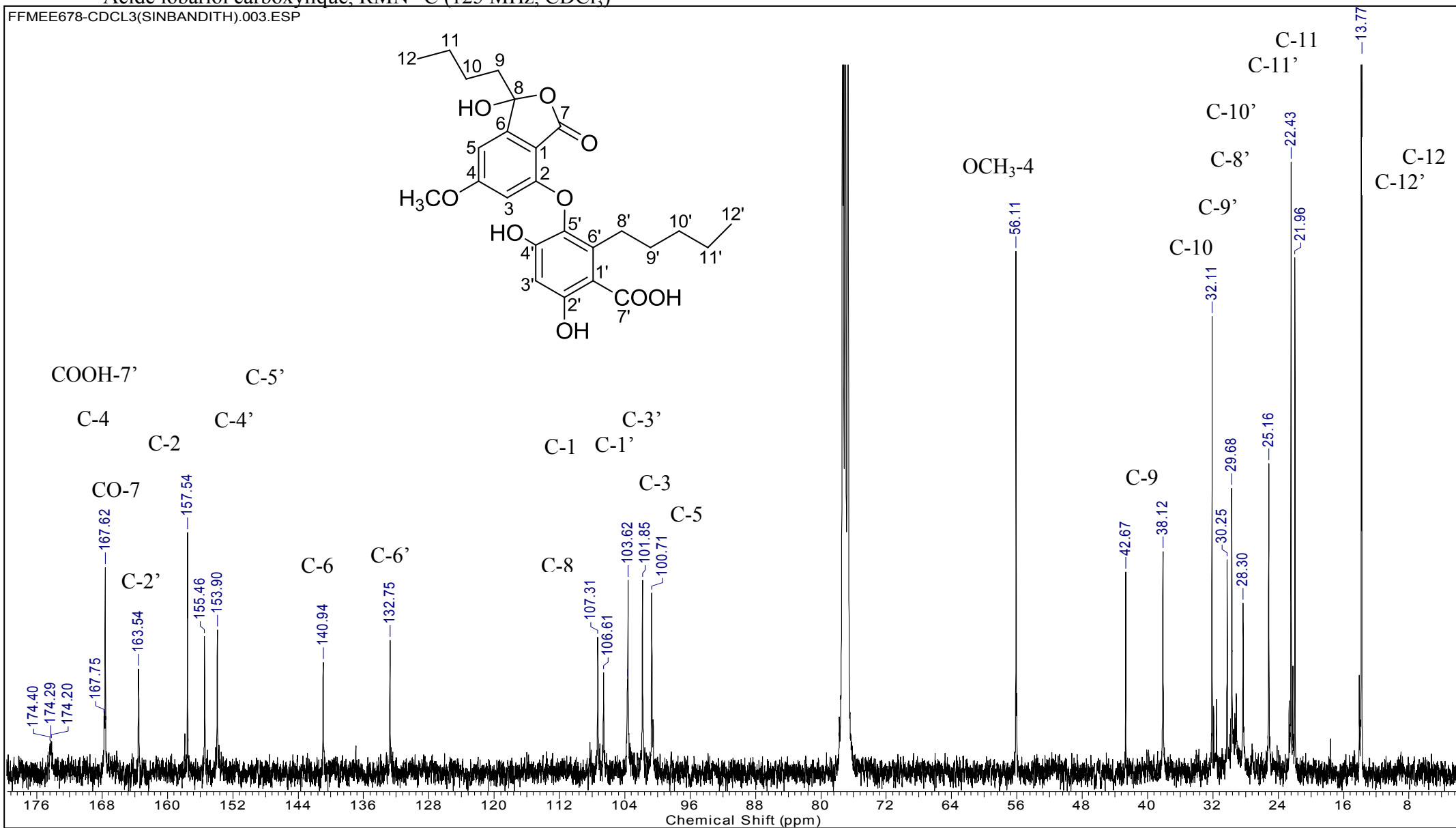
Position	acide lobariol carboxylique (500 MHz, $CDCl_3$ )		HMBC
	$\delta_C^a$	$\delta_H^a$ (mult., $J$ in Hz)	
1	106.61, C	-	-
2	157.54, C	-	-
3	101.85, CH	6.09, s	1, 2, 4
4	167.75, C	-	-
5	100.71, CH	6.64, s	3, 8
6	140.94, C	-	-
7	167.62, C	-	-
8	107.31, C	-	-
9	38.12, $CH_2$	2-2.2, m	10
10	32.11, $CH_2$	1.17, m	11
11	21.96, $CH_2$	1.17, m	10
12	13.77, $CH_3$	0.75, t ( $J=7.0$ )	10, 11
1'	103.68, C	-	-
2'	163.54, C	-	-
3'	103.62, CH	6.51, s	1', 2'
4'	155.46, C	-	-
5'	153.90, C	-	-
6'	132.75, C	-	-
7'	174.40, C	-	-
8'	28.30, $CH_2$	2.6-2.9, m	-
9'	30.25, $CH_2$	1.35, m	-
10'	25.16, $CH_2$	1.17, m	9'
11'	22.43, $CH_2$	1.35, m	9', 10', 12'
12'	13.83, $CH_3$	0.89, t ( $J=7.1$ )	10', 11'
OCH <sub>3</sub> -4	56.11, $CH_3$	3.80, s	4

Acide lobariol carboxylique, RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Acide lobariol carboxylique, RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

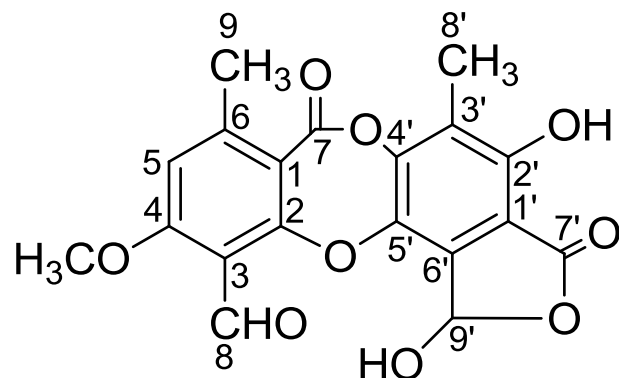
FFMEE678-CDCL3(SINBANDITH).003.ESP





## Acide stictique

Structure



Sources: *S. montagneanum* Lamb

Aspect: blanc amorphe

CCM; R<sub>f</sub> = 0,26 (C), R<sub>f</sub> = 0,31 (G).

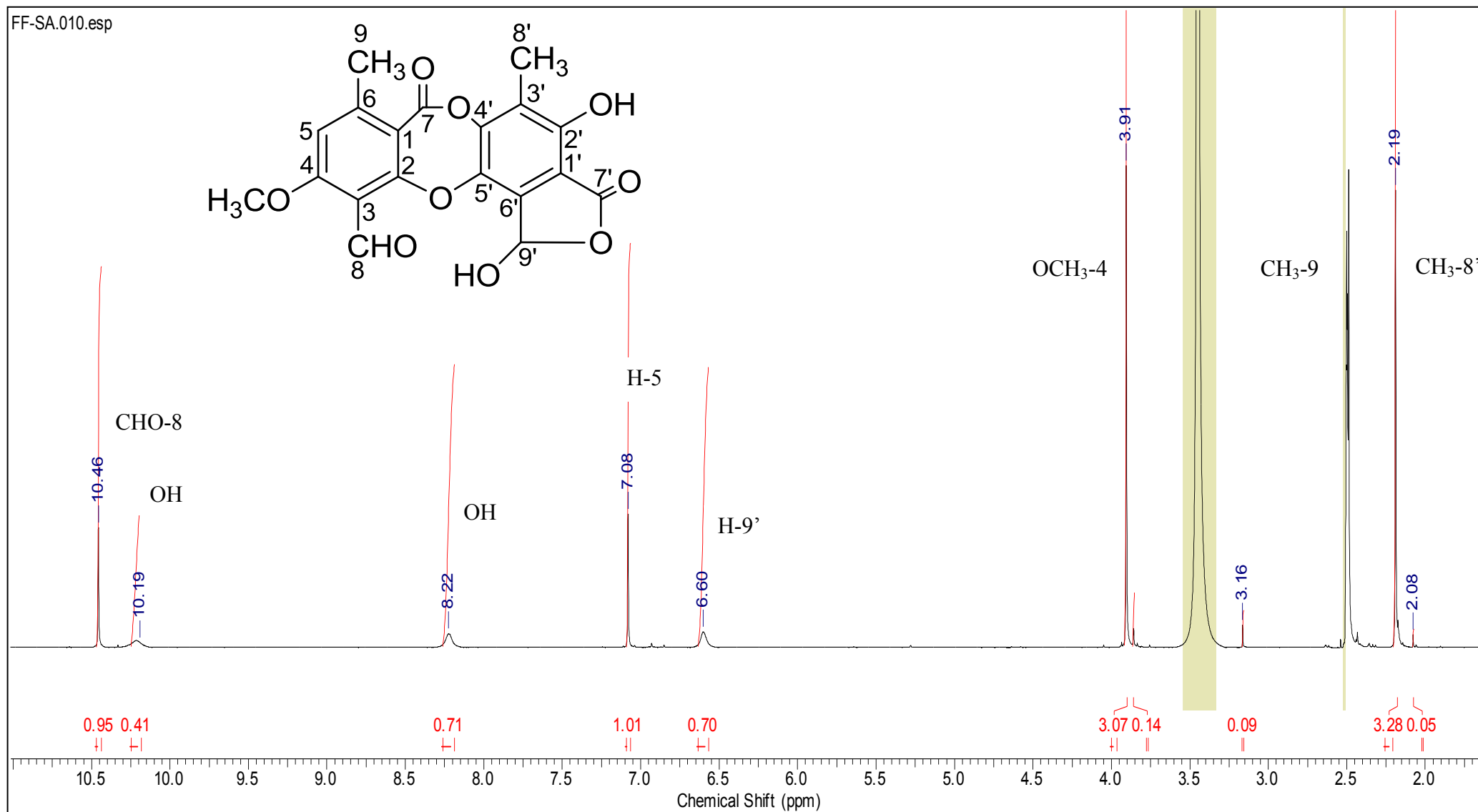
MS: HRESIMS  $m/z$  385.0567 [M-H]<sup>-</sup> (calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>O<sub>9</sub>, 385.0566)

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 237 (3.84); 273 (3.46); 313 (3.24)

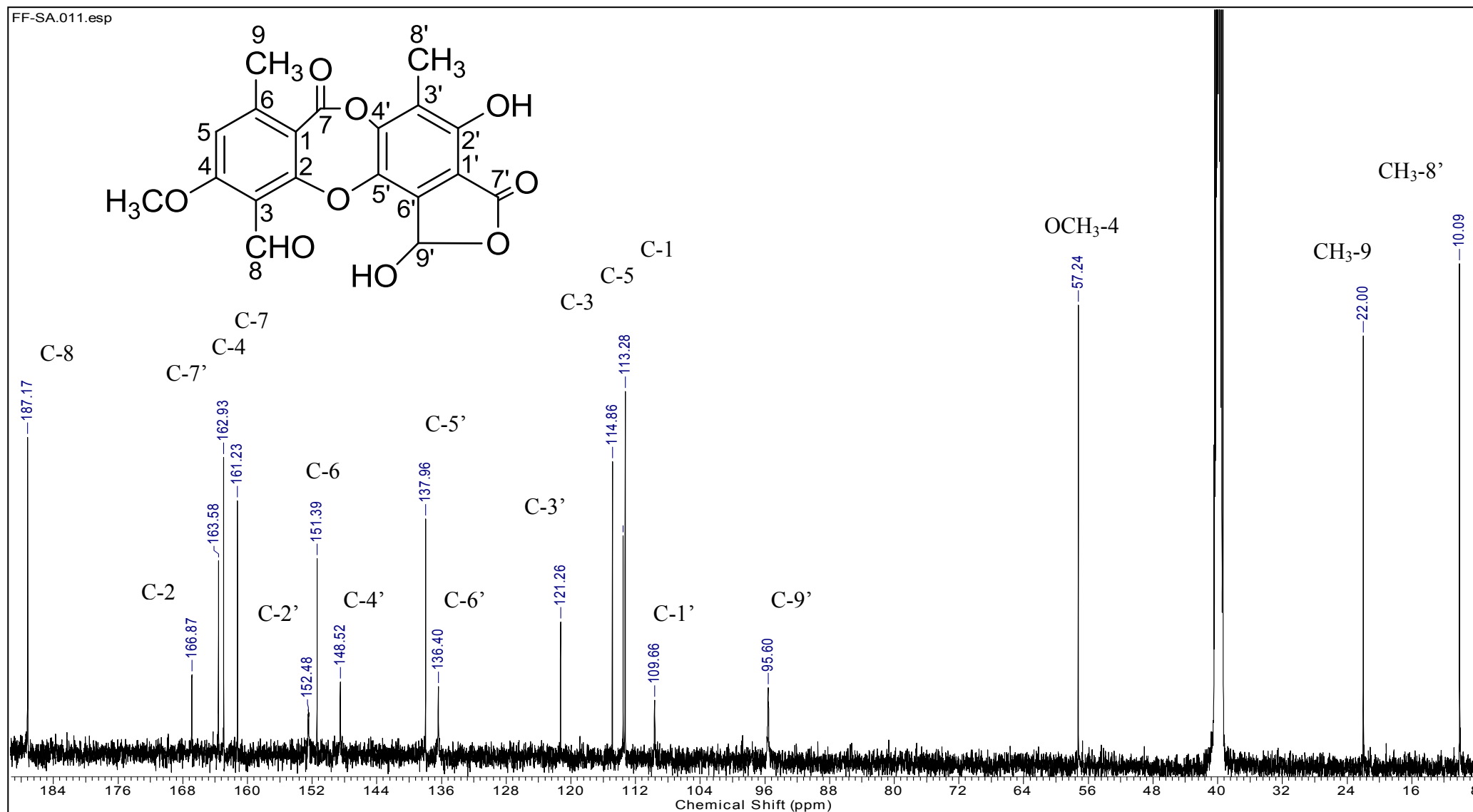
FTIR (acetone)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3423, 2928 (OH, phenolique), 1738 (CO, cétonique), 1691 cm<sup>-1</sup> (CO, carboxylique)

position	acide stictique (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., <i>J</i> in Hz)
1	113.28	-
2	166.87	-
3	114.86	-
4	162.93	-
5	113.54	7.08 (1H,s)
6	151.39	-
7	161.23	-
CHO-8	187.17	10.46 (1H,s)
9	22.00	2.46 (3H,s)
1'	109.66	-
2'	152.48	-
3'	121.26	-
4'	148.52	-
5'	137.96	-
6'	136.40	-
7'	163.58	-
8'	10.09	2.19 (3H,s)
9'	95.60	6.60 (1H,s)
OCH <sub>3</sub> -4	57.24	3.91 (3H,s)
OH	-	8.22 (1H,s)
OH	-	10.19 (1H,s)

Acide stictique, RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

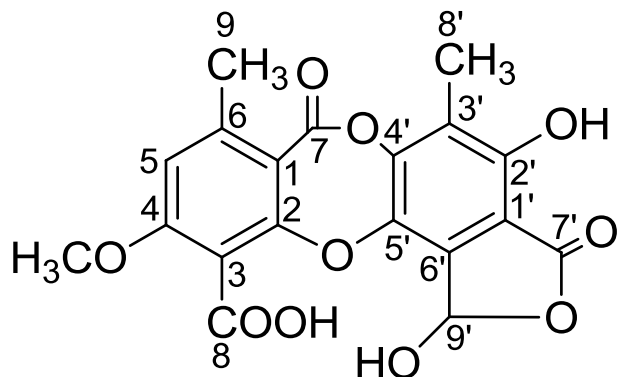


Acide stictique, RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)



## Acide périctictique

Structure



Sources: *S. montagneanum* Lamb

Aspect: blanc amorphe

CCM; R<sub>f</sub> = 0,07 (C), R<sub>f</sub> = 0,23 (G).

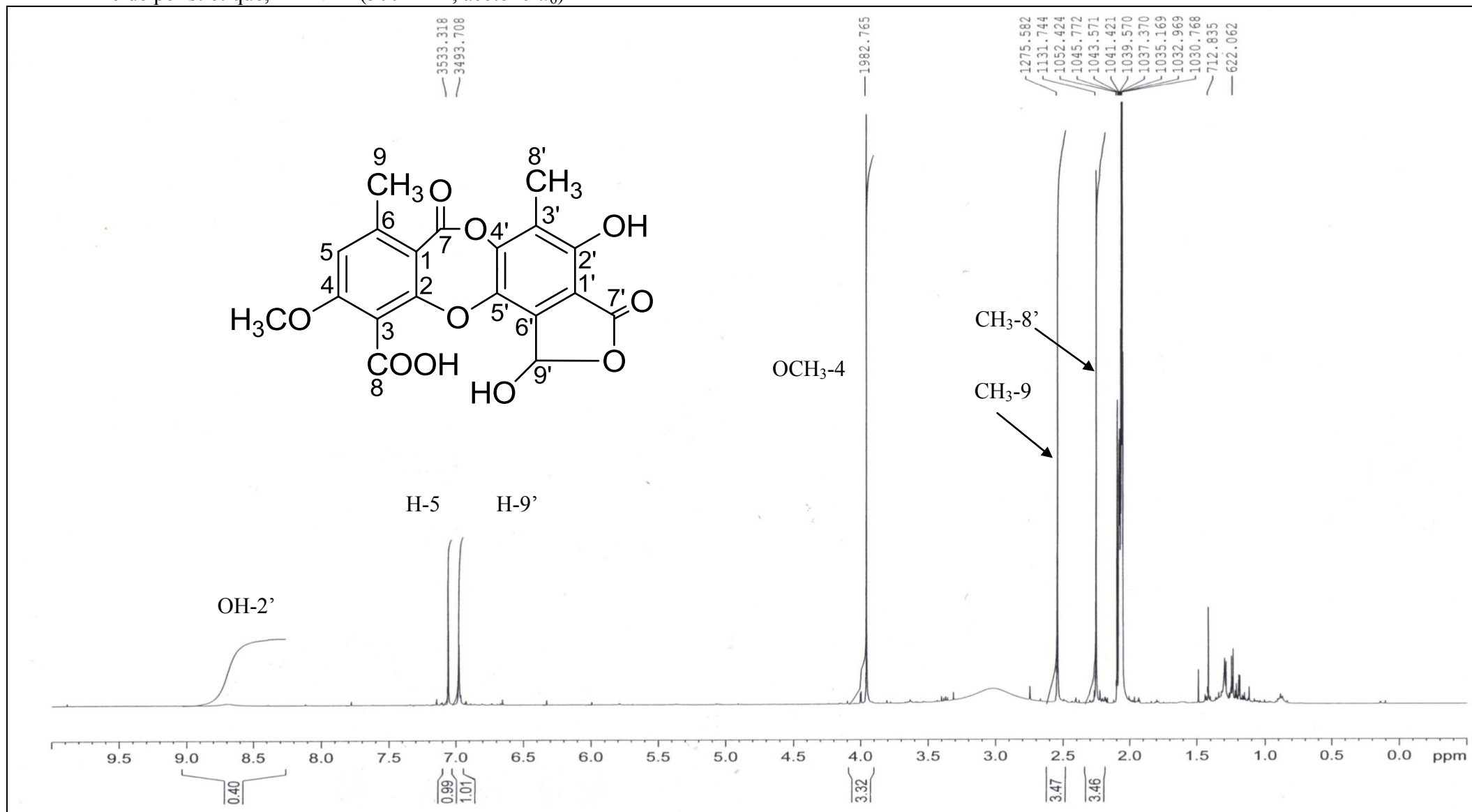
MS: HESIMS *m/z* 401.0511 [M-H]<sup>-</sup>; (calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>O<sub>10</sub>, 401.0514)

UV (MeOH) λ<sub>max</sub> (log ε): 215 (4.15), 266 (3.41) and 315 (3.20) nm

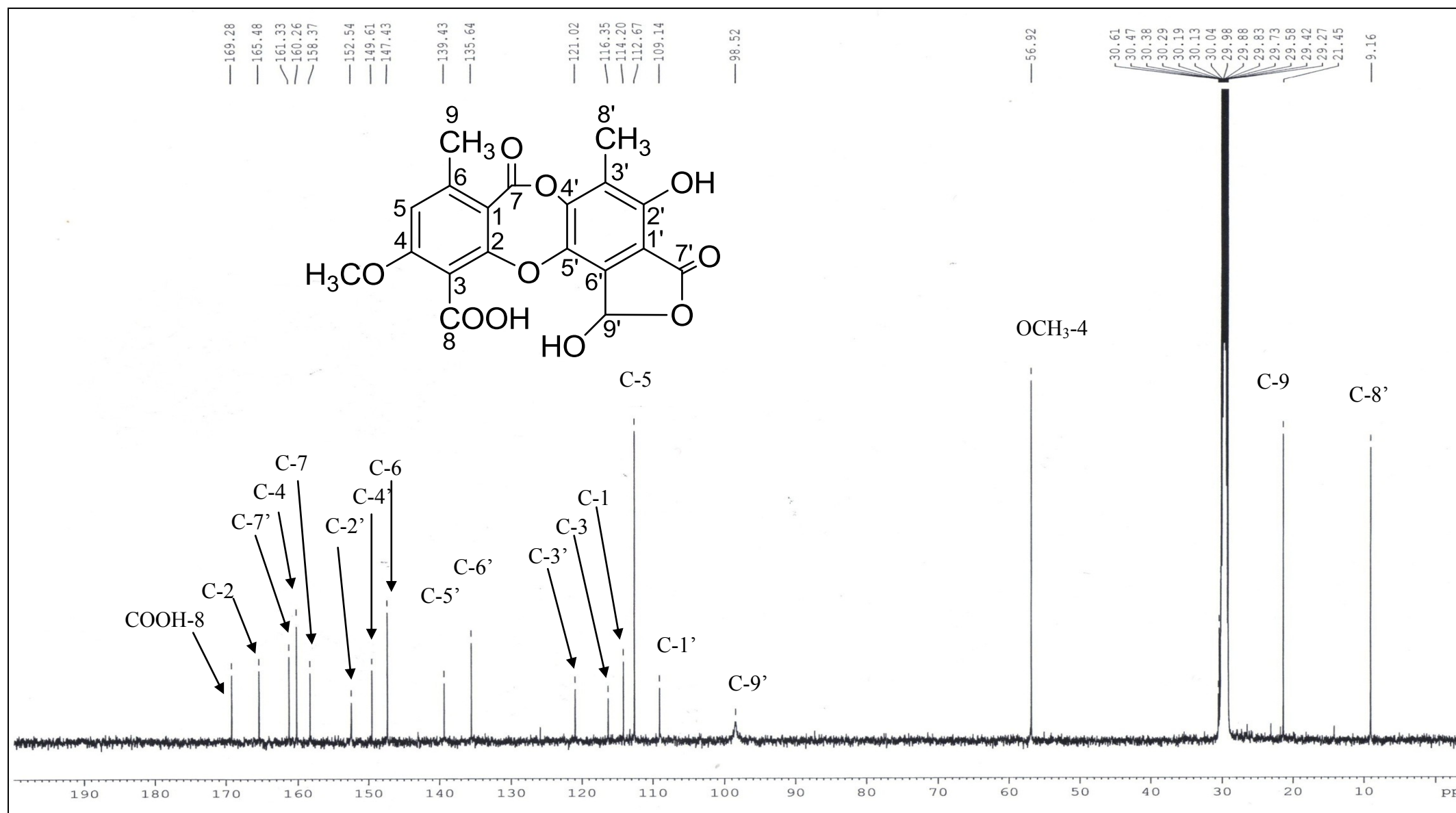
FTIR (acetone) ν<sub>max</sub> (cm<sup>-1</sup>): 3419, 2951 (OH, phenolique), 1731 (CO, cétonique), 1609 cm<sup>-1</sup> (CO, carboxylique)

position	acide périctictique (500 MHz, acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> )		HMQC	HMBC
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)		
1	114.20	-	-	-
2	165.48	-	-	-
3	116.35	-	-	-
4	160.26	-	-	-
5	112.67	7.05(1H,s)	5	1, 2, 3, 4, 7, 9
6	147.43	-	-	-
7	158.39	-	-	-
8	169.28	-	-	-
9	21.45	2.54 (3H,s)	9	1, 5, 6
1'	109.14	-	-	-
2'	152.54	-	-	-
3'	121.02	-	-	-
4'	149.61	-	-	-
5'	139.43	-	-	-
6'	135.64	-	-	-
7'	161.33	-	-	-
8'	9.16	2.25 (3H,s)	8'	2', 3', 4'
9'	98.52	6.98 (1H,s)	9'	-
OCH <sub>3</sub> -4	56.92	3.98 (3H,s)	OCH <sub>3</sub> -4	4
OH	-	-	-	-
OH	-	8.69 (1H,s)	-	-

Acide périctictique, RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz, acetone- $d_6$ )

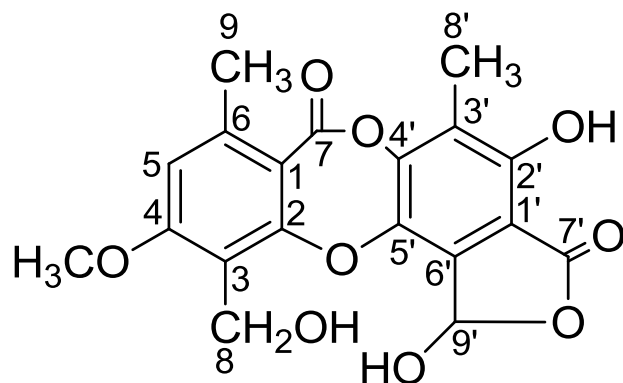


$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, acetone- $d_6$ )



# Acide cryptostictique

Structure



Sources: *S. montagneanum* Lamb.

Aspect: Jaune pâle amorphe

CCM; Rf= 0,1 (C), Rf= 0,22 (G).

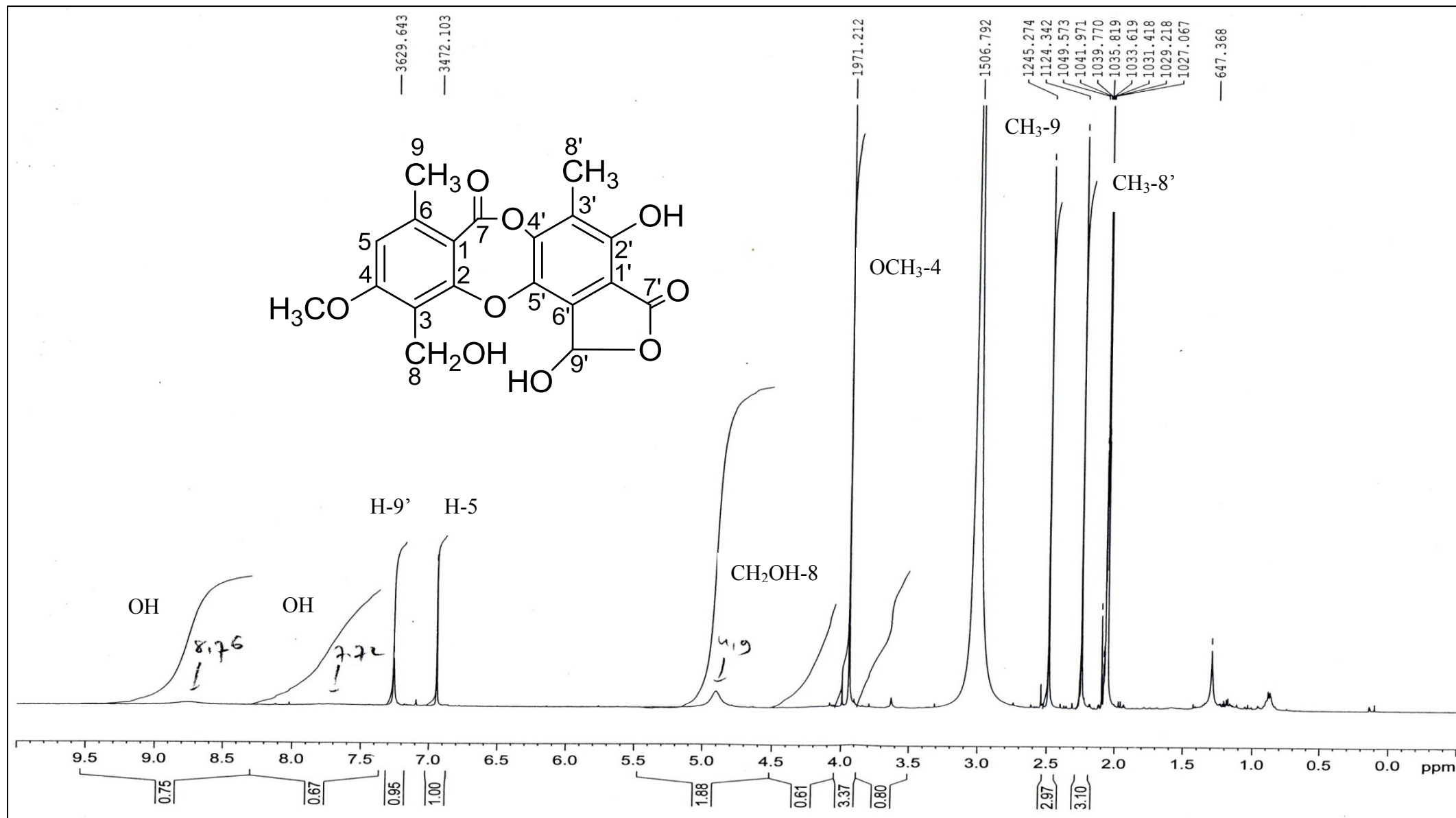
MS: HESIMS  $m/z$  387.0722 [M-H]<sup>-</sup>; (calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>O<sub>9</sub>, 387.0716)

UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ): 219 (4.00), 267 (3.43) and 317 (3.08) nm

FTIR (acetone)  $\nu_{\text{max}}$  (cm<sup>-1</sup>): 3428, 2924 (OH, phenolique), 1731 (CO, cétonique), 1608 cm<sup>-1</sup> (CO, carboxylique)

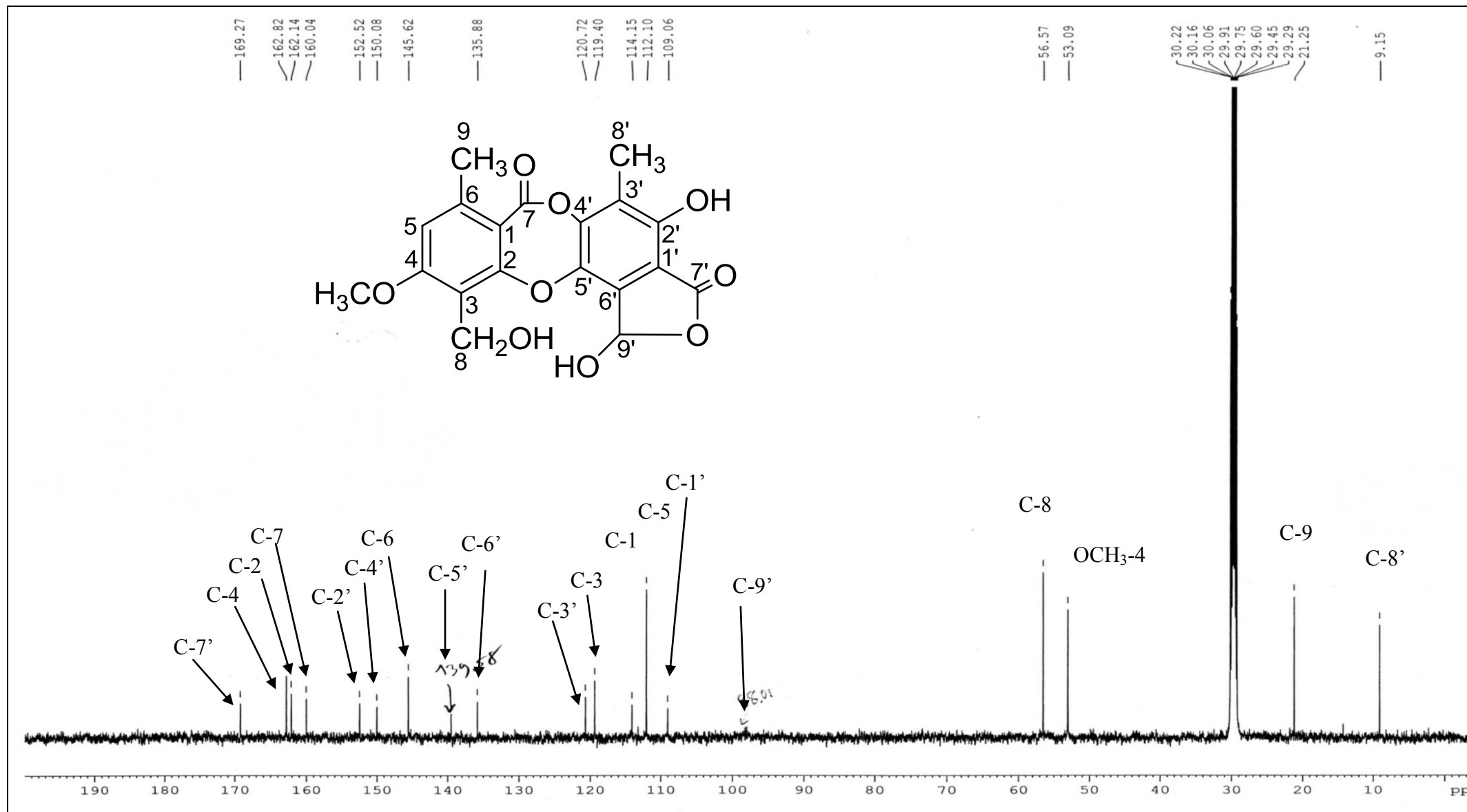
position	acide cryptostictique (500 MHz, acetone- <i>d</i> <sub>6</sub> )		HMQC	HMBC
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (mult., <i>J</i> in Hz)		
1	114.15	-	-	-
2	162.14	-	-	-
3	119.40	-	-	-
4	162.82	-	-	-
5	112.10	6.94(1H,s)	5	1, 3, 9
6	145.62	-	-	-
7	160.04	-	-	-
8	53.09	4.96 (2H,s)	8	-
9	21.25	2.49 (3H,s)	9	1, 5, 6
1'	109.06	-	-	-
2'	152.52	-	-	-
3'	120.72	-	-	-
4'	150.08	-	-	-
5'	139.58	-	-	-
6'	135.88	-	-	-
7'	169.27	-	-	-
8'	9.15	2.22 (3H,s)	8'	2', 3', 4'
9'	98.01	7.28 (1H,s)	-	-
OCH <sub>3</sub> -4	56.57	3.94 (3H,s)	OCH <sub>3</sub> -4	4
OH	-	7.72 (1H,s)	-	-
OH	-	8.76 (1H,s)	-	-

Acide cryptostictique, RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, acetone-*d*<sub>6</sub>)



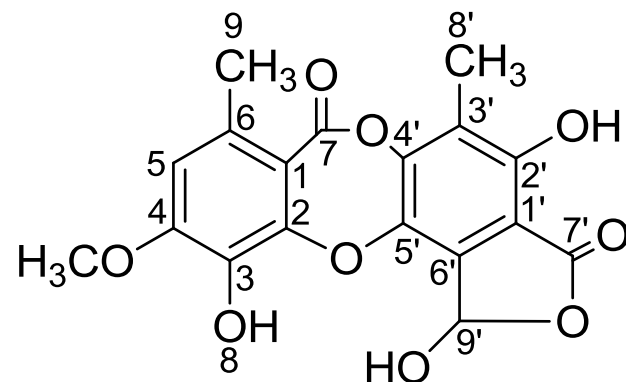


Acide cryptostictique  $^{13}\text{C}$  (125 MHz, acetone- $d_6$ )



# Acide ménégazziaïque

Structure



Sources: *S. montagneanum* Lamb

Aspect: Jaune pâle amorphe

CCM; Rf= 0,15 (C), Rf= 0,30 (G).

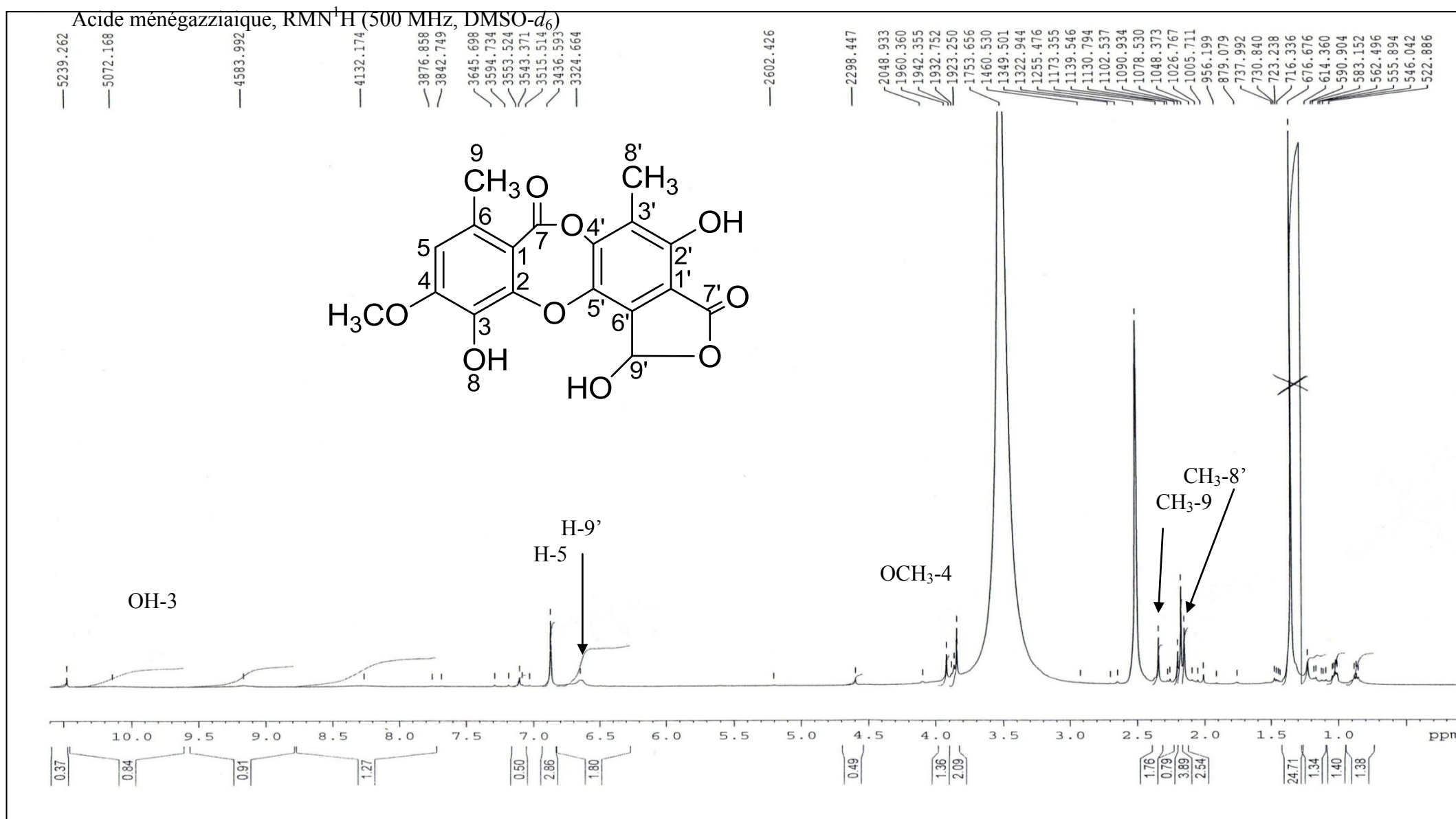
MS: HESIMS  $m/z$  373.0566 [M-H]<sup>-</sup>; (calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>O<sub>9</sub>, 373.0565)

UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ): 216 (4.03), 272 (3.36) and 312 (3.23) nm

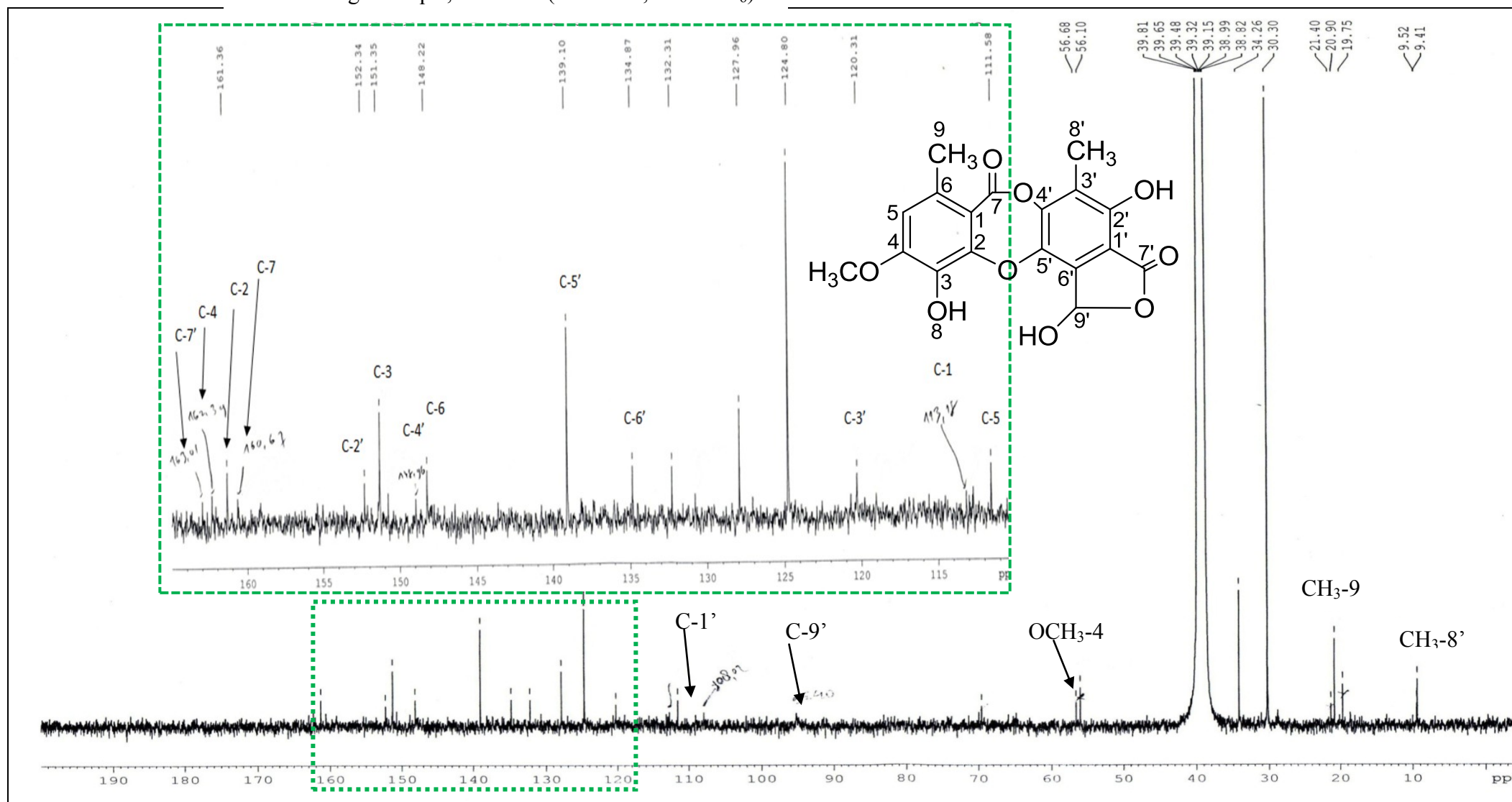
FTIR (MeOH)  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3411, 2941 (OH, phenolique), 1731

(CO, cétonique), 1682 cm<sup>-1</sup> (CO, carboxylique)

position	acide ménégazziaïque (500 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> )		HMBC
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., <i>J</i> in Hz)	
1	113.18	-	-
2	163.01	-	-
3	151.35	-	-
4	162.39	-	-
5	111.58	6.80 (1H,s)	1, 3
6	148.22	-	-
7	160.67	-	-
8	-	10.14 (1H,s)	-
9	19.75	2.36 (3H,s)	1, 5
1'	108.02	-	-
2'	152.34	-	-
3'	120.31	-	-
4'	148.96	-	-
5'	139.10	-	-
6'	134.87	-	-
7'	161.36	-	-
8'	9.41	2.10 (3H,s)	2', 3', 4'
9'	95.40	6.65 (1H,s)	-
OCH <sub>3</sub> -4	56.68	3.90 (3H,s)	4
OH	-	-	-
OH	-	-	-

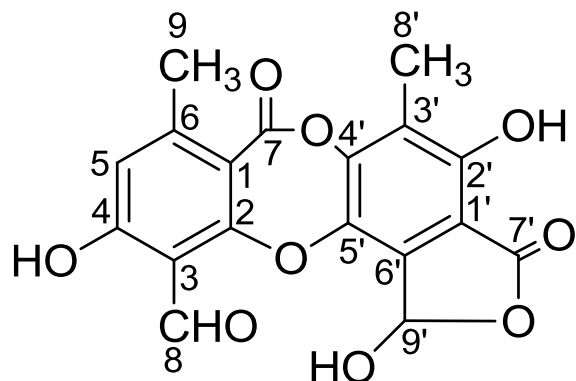


Acide ménégazziaïque, RMN<sup>13</sup>C (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)



## Acide norstictique

Structure



Sources: *S. montagneanum* Lamb

Aspect: blanc amorphe

CCM; Rf= 0,65 (G).

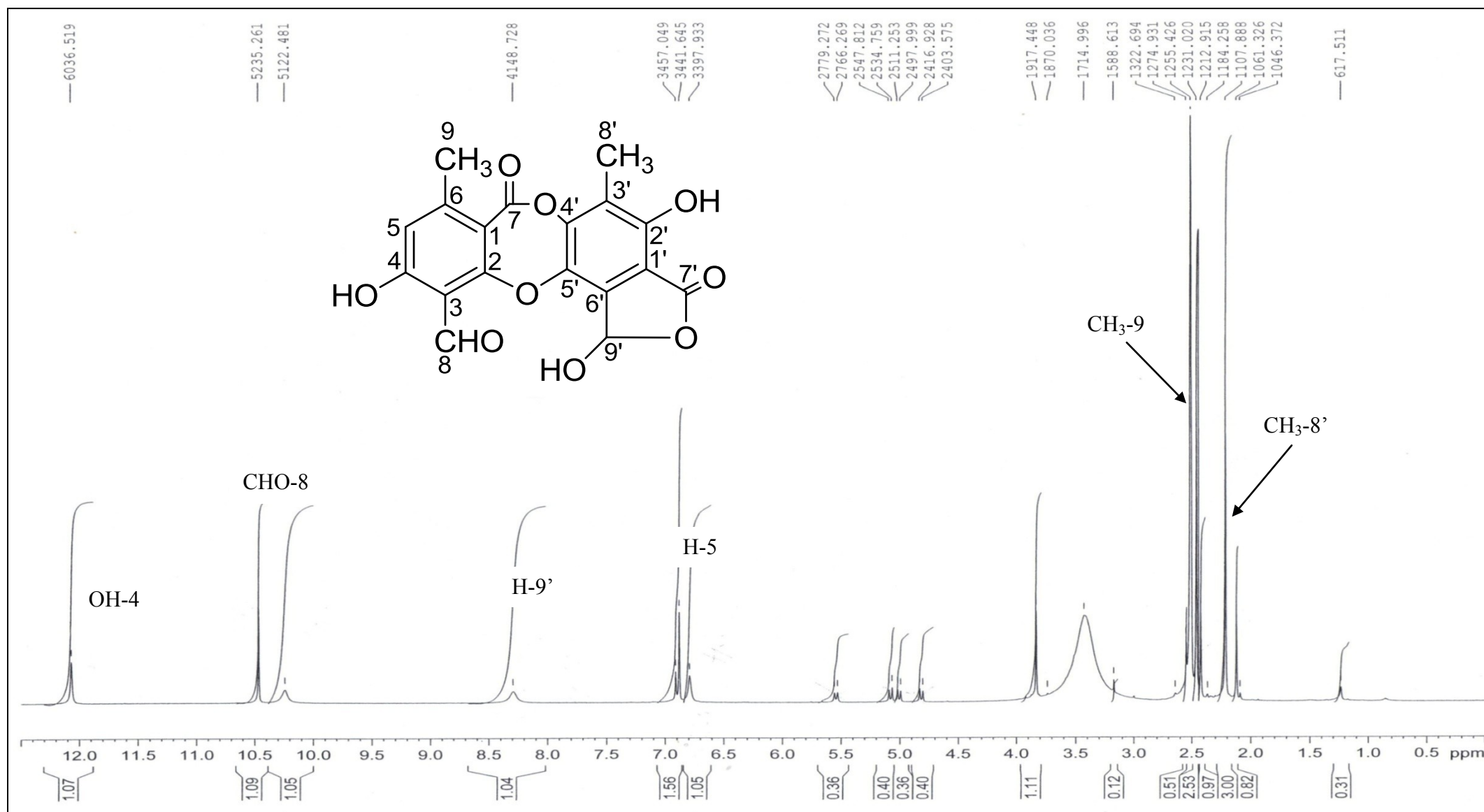
MS: HESIMS  $m/z$  371.0410  $[M-H]^-$ ; (calcd. for  $C_{18}H_{11}O_9$ , 371.0409)

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 229(4.29), 275(3.59), 314(3.04)

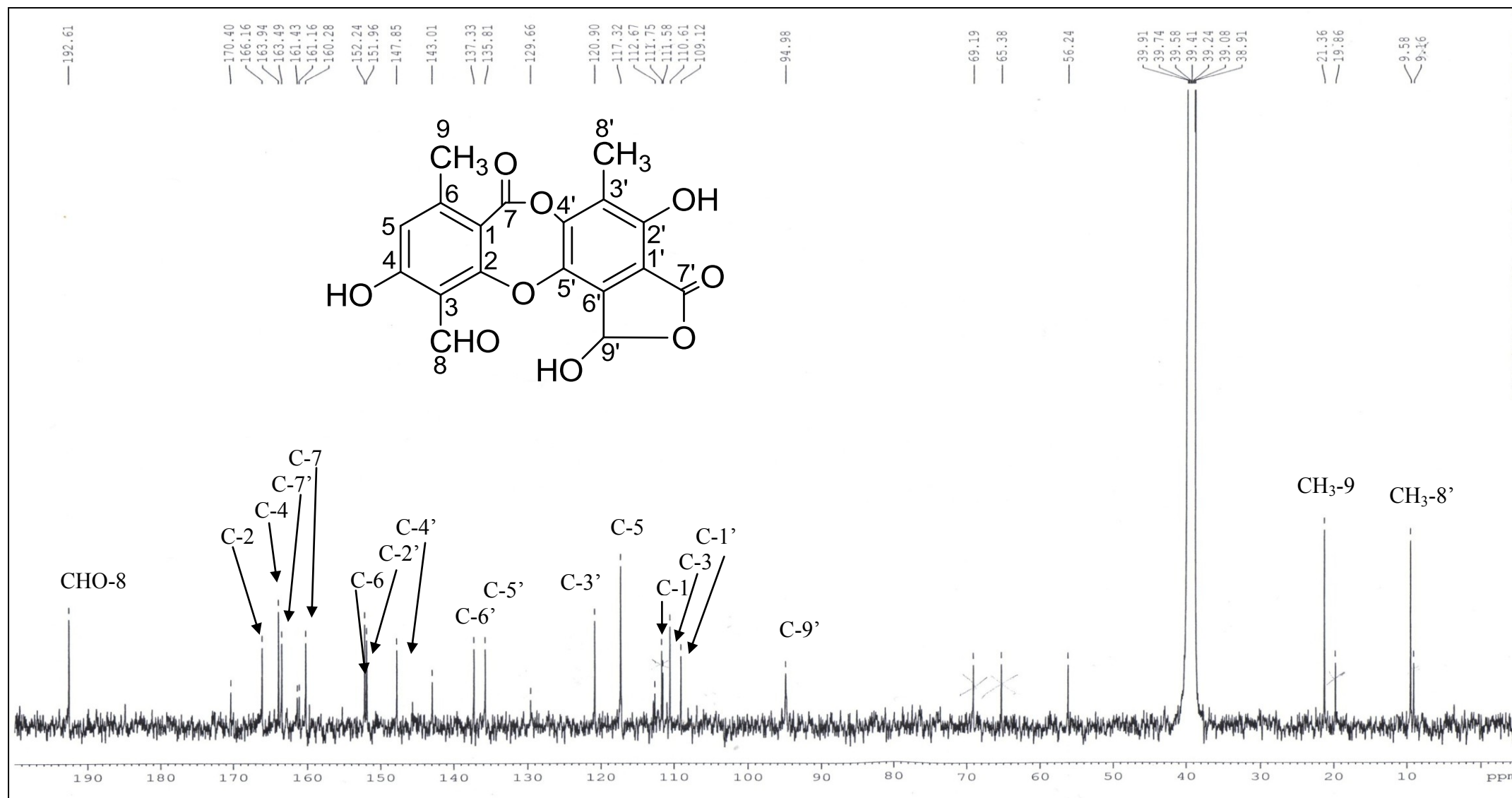
FTIR (THF)  $\nu_{max}$  ( $cm^{-1}$ ): 3395, 2925, 2852 (OH, phenolique), 1736 (CO, cétonique), 1657  $cm^{-1}$  (CO, carboxylique)

position	acide norstictique (500 MHz, DMSO- $d_6$ )		HMQC	HMBC
	$\delta_C$	$\delta_H$ (mult., $J$ in Hz)		
1	111.58	-	-	-
2	166.61	-	-	-
3	110.61	-	-	-
4	163.94	-	-	-
5	117.32	6.88 (1H,s)	5	1, 3, 4, 9
6	152.24	-	-	-
7	160.28	-	-	-
8	192.61	10.50 (1H,s)	8	3, 4, 5
9	21.36	2.48 (3H,s)	9	1, 5, 6
1'	109.12	-	-	-
2'	151.96	-	-	-
3'	120.90	-	-	-
4'	147.85	-	-	-
5'	135.81	-	-	-
6'	137.33	-	-	-
7'	163.49	-	-	-
8'	9.85	2.20 (3H,s)	8'	2', 3', 4', 5', 6'
9'	94.58	6.79 (1H,s)	9'	-
OH-4	-	12.10 (1H,s)	-	4

Acide norstictique, RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)

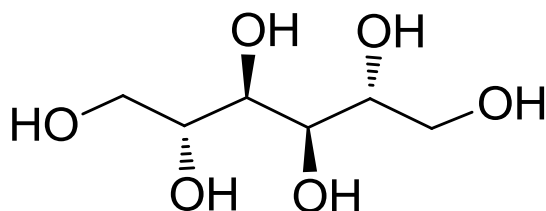


Acide norstictique, RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)



# Mannitol

Structure



Sources: *S. montagneanum* Lamb

Aspect: blanc amorphe

CCM; Rf= 0,32 (*n*-ButOH/ AA/ H<sub>2</sub>O, 40:10:50), Rf= 0,25 CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (6:4:1) (L)

MS: HESIMS *m/z* 205.0688 [M+Na]<sup>+</sup>; (calcd. for C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>Na, 205.0687)

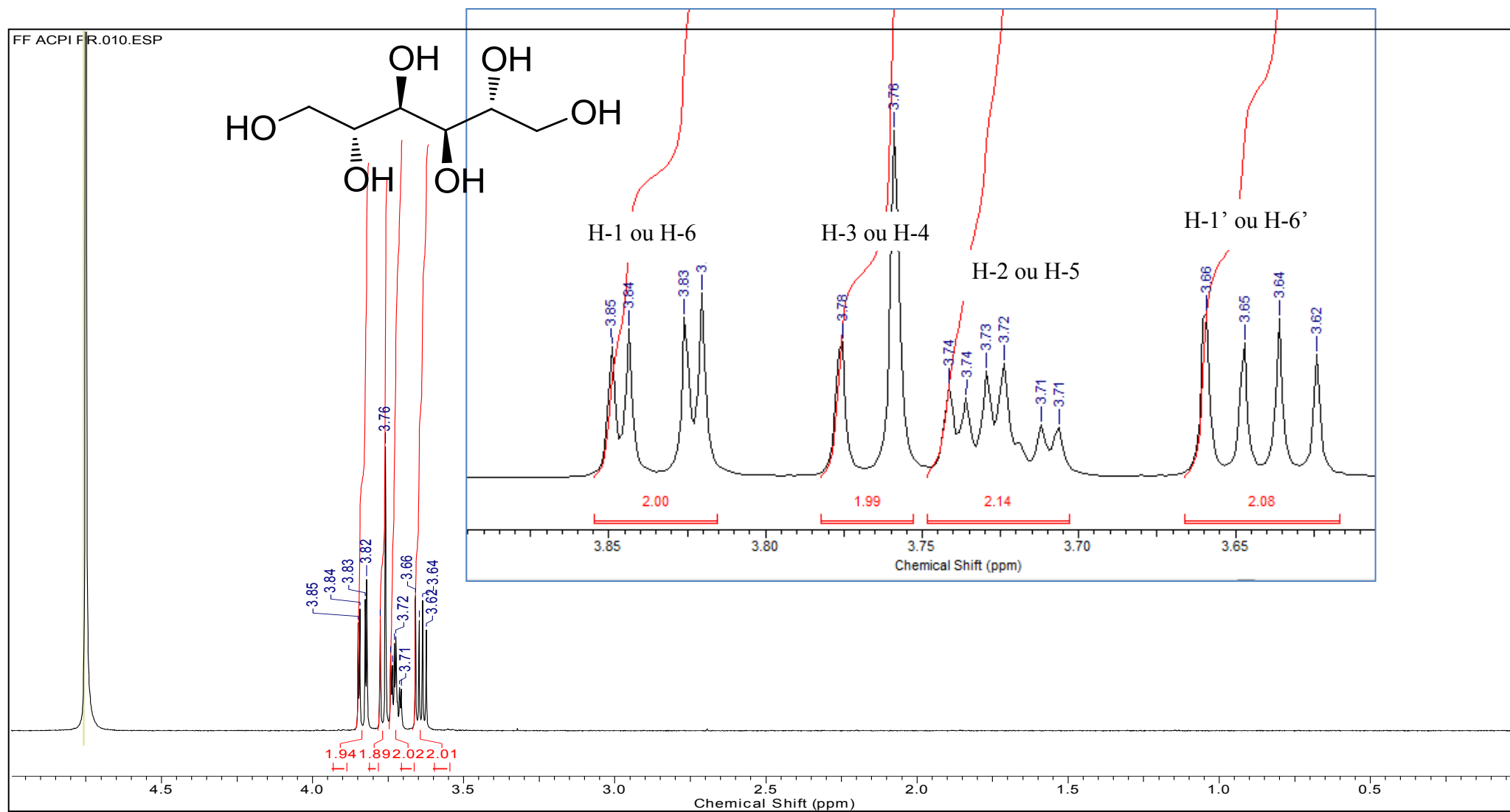
FTIR(KBr): 3277, 2935, 1456, 1081, 1018 cm<sup>-1</sup>

RMN Spectrum

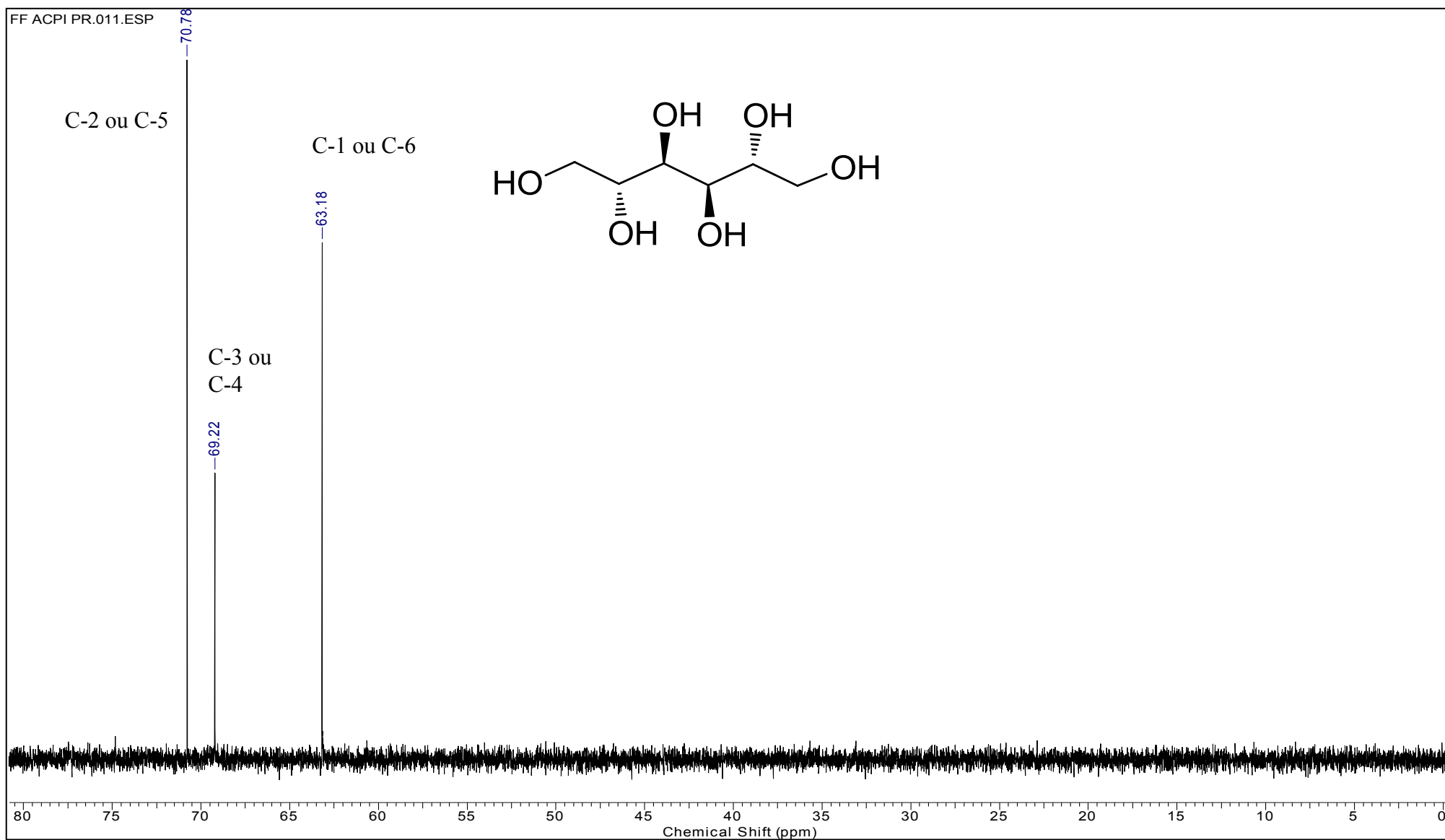
position	Mannitol (500 MHz, D <sub>2</sub> O)	
	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub> (mult., <i>J</i> in Hz)
1	63.18	3.64 (2H, dd, <i>J</i> = 11.8, 6.3) ; 3.84 (2H, dd, <i>J</i> = 11.8, 2.6)
2	70.78	3.73 (2H, ddd, <i>J</i> = 8.6, 6.3, 2.6)
3	69.22	3.78 (2H, d, <i>J</i> = 8.6)
4	69.22	3.78 (2H, d, <i>J</i> = 8.6)
5	70.78	3.73 (2H, ddd, <i>J</i> = 8.6, 6.3, 2.6)
6	63.18	3.64 (2H, dd, <i>J</i> = 11.8, 6.3) ; 3.84 (2H, dd, <i>J</i> = 11.8, 2.6)



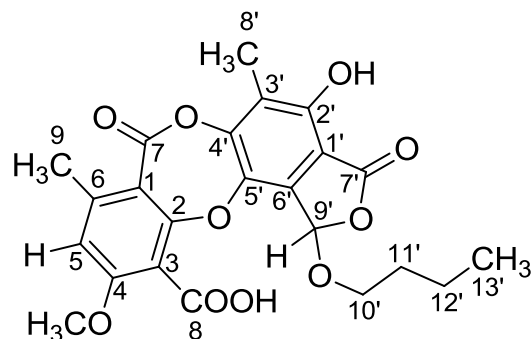
Mannitol, RMN<sup>1</sup>H (500 MHz, D<sub>2</sub>O)



Mannitol, RMN<sup>13</sup>C (125 MHz, D<sub>2</sub>O)



Acide périctictique de 9'- *O*-butyle



Sources: *S. montagneanum* Lamb

Aspect: poudre jaune pale

CCM; Rf= 0.49 (G)

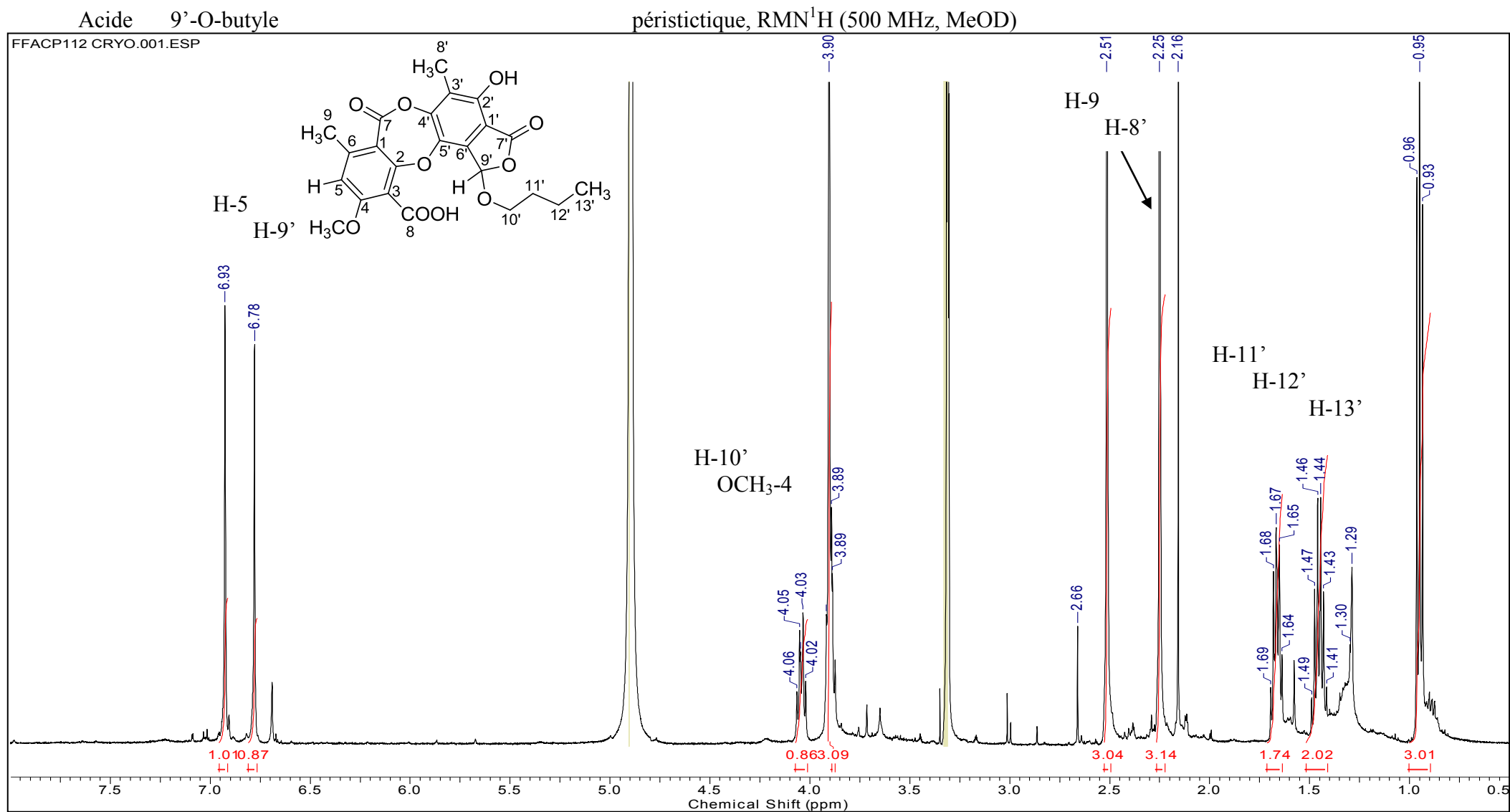
MS: HESIMS  $m/z$  457.1140  $[M-H]^-$ , (calcd. for  $C_{23}H_{21}O_{10}$ , 457.1135)

UV (MeOH)  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ): 218 (4.25), 266 (3.70), 310 (3.30)

FTIR (MeOH): 3419, 2958, 1737, 1609, 1435, 1204, 1112  $cm^{-1}$

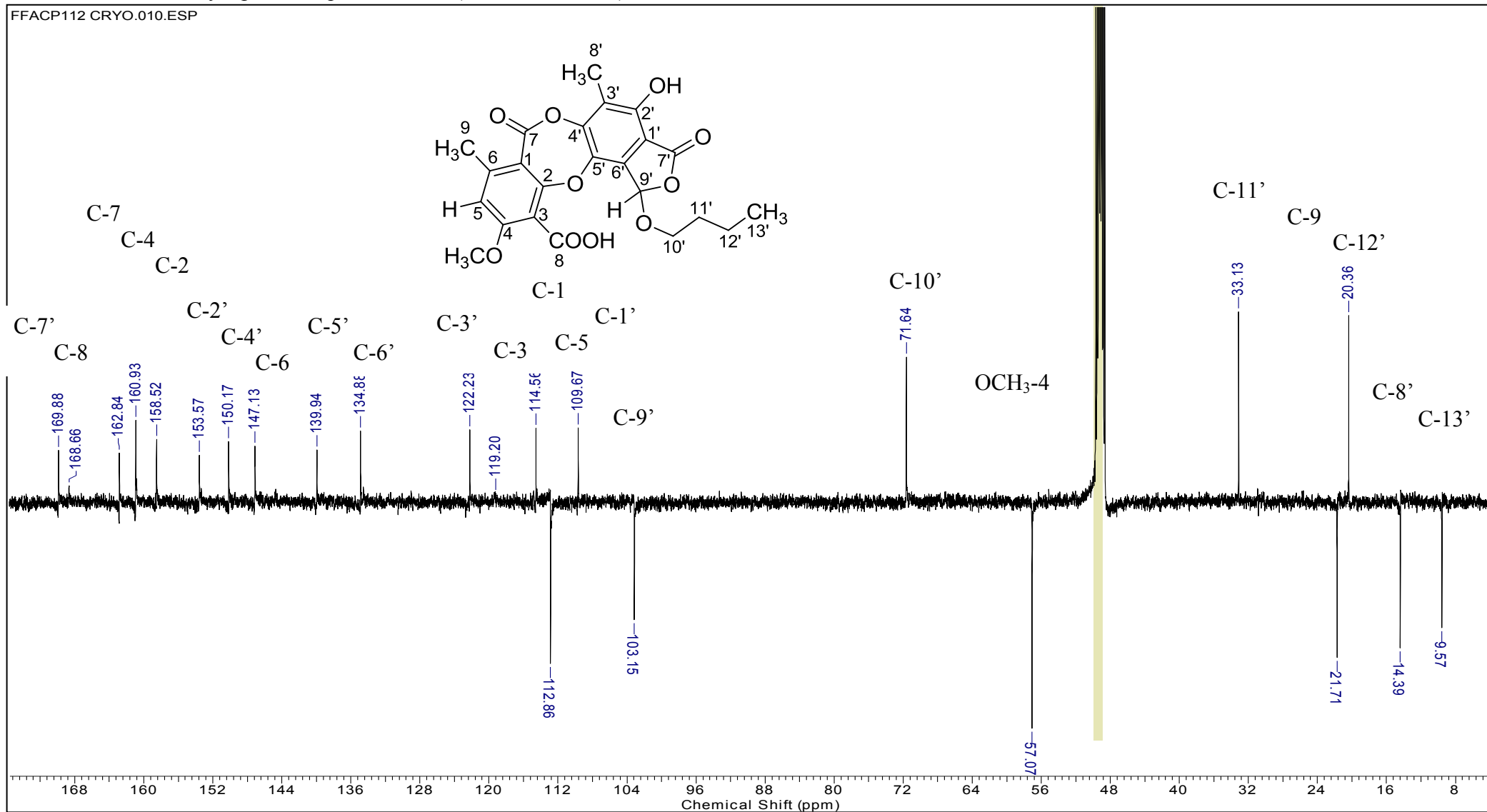
RMN Spectrum

Position	$\delta C$	$\delta H$ (mult., J in Hz)	HMBC	COSY	NOESY
1	114.56	-	-	-	-
2	158.52	-	-	-	-
3	119.20	-	-	-	-
4	160.93	-	-	-	-
5	112.86	6.93, s	1, 4, 7, 8, 9	9-CH <sub>3</sub>	9-CH <sub>3</sub> , 4-OCH <sub>3</sub>
6	147.13	-	-	-	-
7	162.84	-	-	-	-
8	168.66	-	-	-	-
9	21.71	2.51, s	5, 6, 7	H-5	-
1'	109.67	-	-	-	-
2'	153.57	-	-	-	-
3'	122.23	-	-	-	-
4'	150.17	-	-	-	-
5'	139.94	-	-	-	-
6'	134.88	-	-	-	-
7'	169.88	-	-	-	-
8'	14.39	2.25, s	2', 3', 4'	-	-
9'	103.15	6.78, s	1', 4', 5', 7',	-	H <sub>2</sub> -10'
10'	71.64	4.03, m	10'	H <sub>2</sub> -11'	H <sub>2</sub> -11'
11'	33.13	1.67, m	-	H <sub>2</sub> -10', H <sub>2</sub> -12'	H <sub>2</sub> -10', H <sub>2</sub> -12', H <sub>2</sub> -13'
12'	20.36	1.44, m	10'	H <sub>2</sub> -11', 13'-	13'
13'	9.57	0.95, t (7.3)	10', 11'	CH <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> -11', 13'-CH <sub>3</sub>
4-OCH <sub>3</sub>	57.07	3.90, s	12', 11'	H <sub>2</sub> -12'	H <sub>2</sub> -11', H <sub>2</sub> -12'
			-	-	-



Acide 9'-O-butyle périctictique, RMN<sup>13</sup>C (125MHz, MeOD)

FFACP112 CRYO.010.ESP



## REFERENCES



## References

- Abrahams, A., F. Lohézic-Le Dévéhat, et al. (2008). Lichen-derived compounds, lichesterinic and protolichesterinic, mediate pigmentation in B16 melanoma cells. *7 th Joint Meeting Natural Products with pharmaceutical, nutraceutical, cosmetic and agrochemical interest*, Athenes, Greece.
- Aghoramurthy, K., K. G. Sarma, et al. (1961). Chemical investigation of indian lichens : Part XXV - Chemical components of some rare himalayan lichens. *Journal of Scientific & Industrial Research* **20B**: 166-168.
- Asahina, Y. and S. Nonomura (1935). Untersuchungen über Flechtenstoffe, LVI. Mitteil.: Über die Konstitution der Lobarsäure (I. Mitteil.). *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* **68**(9): 1698–1704.
- Asahina, Y. and S. Shibata (1971). *Chemistry of lichen substances*. Tokyo, Asher (Vaals).
- Balskus, E. P. and C. T. Walsh (2010). The Genetic and Molecular Basis for Sunscreen Biosynthesis in Cyanobacteria. *Science* **329**: 1653-1656
- Baron, M., P. A. J. Gorin, et al. (1988). Isolation and identification of a linear (1→3)-linked  $\beta$ -D-glucan and other carbohydrate components of the lichen *Stereocaulon ramulosum* (SW.) Räscher. *Carbohydrate Research* **177**: 235-239.
- Baron, M., P. A. J. Gorin, et al. (1989). Structural Studies on a Galactomannan Isolated from the Lichen *Stereocaulon ramulosum*. *Agricultural and Biological Chemistry* **53**(7): 1751-1758.
- Begg, W. R., D. O. Chester, et al. (1979). The structure of conorlobaridone and conloxodin. New depsidones from the lichen *Xanthoparmelia xanthosorediata*. *Australian Journal of Chemistry* **32**: 927-929.
- Behera, B.-C., B. Adawadkar, et al. (2003). Inhibitory activity of xanthine oxidase and superoxyde-scavenging activity in some taxa of the lichen family Graphidaceae. *Phytomedicine* **10**: 536-543.
- Boik, J. (2001). *Natural Compounds in Cancer Therapy*. Minnesota, Oregon Medical Press.
- Bolognese, A., F. Chioccare, et al. (1974). Isolation and characterization of atranorin and 4,6-dihydroxy-2-methoxy-3-methylacetophenone from *Stereocaulon vesuvianum*. *Phytochemistry* **13**(9): 1989-1990.
- Boustie, J., M.-D. Galibert-Anne, et al. (2011). Paraconic acids as pigmentation activators, WO 2011107720 A1 20110909, France.
- Boustie, J. and M. Grube (2005). Lichens-a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources* **3**(2): 273-287.
- Bremer, B. and M. Thulin (1998). Collapse of Isertiaceae, re-establishment of Mussaendeae, and a new genus of Sabiceae (Rubiaceae); phylogenetic relationships based on rbcL data. *Plant Systematics and Evolution* **211**: 71-92.
- Brenner, M. and V. Hearing (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemical and Photobiology*. **84**(3): 539-549.
- Brown, L. R. (1997 ). *State of the World 1997: A Worldwatch Institute Report on Progress Toward a Sustainable Society*. New York, W. W. Norton & Company.
- Bruun, T. (1973). Bourgeanic acid in the lichen *Stereocaulon tomentosum*. *Acta Chemica Scandinavica* **27**(8): 3120.
- Bruun, T. (1976). Brassicasterol in *Cladonia gonecha* and *Stereocaulon tomentosum*. *Phytochemistry* **15**(7): 1179-1180.
- Bugni, T. S., C. D. Andjelic, et al. (2009). Biologically active components of a Papua New Guinea analgesic and anti-inflammatory lichen preparation. *Fitoterapia* **80**(5): 270-273.
- Caccamese, S., A. Compagnini, et al. (1986). Methyl- $\beta$ -orcinolcarboxylate and atranol from the lichen *Stereocaulon vesuvianum*. *Journal of Natural Products* **49**(6): 1159-1160.



- Cai, Z., M. Song, et al. (2009). Phenolic constituents of *Stereocaulon paschale* Hoffm. *Sanxia Daxue Xuebao, Ziran Kexueban* **31**(2): 94-95,109.
- Cambie, R. C. (1968). The depsides from *Stereocaulon ramulosum* (SW.)RAÜSCH. *New Zealand Journal of Science* **11**(1): 48-54.
- Chooi, Y. H. (2008). Genetic Potential of Lichen-Forming Fungi in Polyketide Biosynthesis. Ph.D. Thesis. Academic departement. Melbourne.Universty.: 56-60.
- Choquenot, B., C. Couteau, et al. (2008). Quercetin and rutin as potential sunscreen agents : determination of efficacy by an *in vitro* method. *Journal of Natural Products* **71**: 1117-1118.
- Cocchietto, M., N. Skert, et al. (2002). A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Die Naturwissenschaften* **89**: 137-146.
- Comber, M. F., M. V. Sargent, et al. (1989). Depsidone synthesis. Part 24. The synthesis of epiphorellic acid 2. A pseudodepsidone and X-ray crystal structure of a grisadienedione epoxide. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I*(3): 441-448.
- Culberson, C. F. and J. A. Elix (1989). Lichen substances. *Methods in Plant Biochemistry*. J. B. Harborne. London, Academic Press. **Vol. I Plant Phenolics**: 509- 532.
- Czeczuga, B. (1986). Investigations on carotenoids in lichens. XI. Lichens from Lapland. *Annales Botanici Fennici* **23**(3): 251-254.
- Davidson, T. A. and A. I. Scott (1961). Oxidative pairing of phenolic radicals. Part II. The synthesis of picrolichenic acid. *Journal of Chemical Society Perkin Transactions I*: 4075-4078.
- Diffey, B. L. and J. Robson (1989). A new substrate to measure sunscreen protection factors throughout the ultraviolet spectrum. *Journal of the Society Cosmetic Chemists*. **40**: 127-133.
- Dodge, C. W. (1929). A synopsis of *Stereocaulon* with notes on some exotic species. *Annales de cryptogamie exotique* **2**(2): 93-153.
- Duvigneaud, P. (1956). Les Stereocaulons des hautes montagnes du Kivu. *Revue de botanique* **14**: 1-141.
- El Ghissassi, F., R. S. Baan , Kurt , et al. (2009). A review of human carcinogens—Part D: radiation. *The Lancet Oncology* **10**(8): 751-752.
- Elix, J. A. (1996). Biochemistry and secondary metabolites. *Lichen Biology*. T. H. Nash. Cambridge, Cambridge University Press: 154-180.
- Elix, J. A. and J. H. Wardlaw (2000). Lusitanic Acid, Peristic Acid and Verrucigeric Acid. Three New  $\beta$ -Orcinol Depsidones from the Lichens *Relicina sydneyensis* and *Xanthoparmelia verrucigera*. *Australian Journal of Chemistry* **53**: 815-818.
- Foo, L. Y. and D. J. Galloway (1979). Pseudodepsidones and other constituents from *Xanthoparmelia scabrosa*. *Phytochemistry* **18**(12): 1977-1980.
- Fox, C. H. and S. Huneck (1970). Inhaltsstoffe von einigen *Stereocaulon* - arten. *Phytochemistry* **9**(9): 2059.
- Fox, C. H., E. Klein, et al. (1970). Colensoinsäure, ein neues depsidon aus *Stereocaulon colensoi*. *Phytochemistry* **9**(12): 2567-2571.
- Fraser, M.-H., A. Cuerrier, et al. (2007). Medicinal plants of Cree communities (Québec, Canada): antioxidant activity of plants used to treat type 2 diabetes symptoms. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **85**(11): 1200-1214.
- Gladstein, D. S. and W. C. Wheeler (1997). POY: The optimization of alignment characters. Program and documentation. Available at <ftp.amnh.org/pub/molecular>.
- Gonzalez, A. G., E. M. Rodriguez Perez, et al. (1992). Chemical constituents of the lichen *Stereocaulon azureum*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **47**(7-8): 503-507.

- Gorin, P. A. J. and M. Iacomini (1985). Structural diversity of D-galacto-D-mannan components isolated from lichens having ascomycetous mycosymbionts. *Carbohydrate Research* **142**(2): 253-267.
- Groenhart, P. (1950). Malaysian lichen--II. Two new species from Java. *Reinwardtia* **1**(1): 33-39.
- Groenhart, P. (1951). Malaysian lichens--III. Cyanoporina Groenh., an interesting lichen from Java. *Reinwardtia* **1**(2): 197-198.
- Groenhart, P. (1954). Malaysian lichens--IV. *Reinwardtia* **2**(3): 385-402.
- Groenhart, P. (1958). Two new Malaysian lichens. *Blumea Supplement IV*: 107-112.
- Gröniger, A. and D. Hälder (2002). Induction of the synthesis of an UV-absorbing substance in the green alga *Prasiola stipitata*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **66**: 54-59.
- Grube, M. and D. L. Hawksworth (2007). Trouble with lichen: the re-evaluation and re-interpretation of thallus form and fruit body types in the molecular era. *Mycological Research* **111**(9): 1116-1132.
- Gyelnik, V. (1931). Additamenta ad cognitionem lichenum extraeuropaeorum. *Annales de Cryptogamie Exotique* **4**: 173-174.
- Hamada, N. and T. Ueno (1990). Lecanoric acid from the mycobiont of the lichen *Stereocaulon curtatum*. *Phytochemistry* **29**(2): 678-679.
- Hanssen, H.-P. and M. Schadler (1985). Pflanzen in der traditionellen chinesischen medizin. *Deutsche Apotheker Zeitung* **24**: 1239-1243.
- Hasegawa, M., Y. Iida, et al. (1985). Phylogenetic relationships among eukaryotic kingdoms inferred from ribosomal RNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* **22**(1): 32-38.
- Hauan, E. and O. Kjoelberg (1971). Studies on the polysaccharides in lichens.I. The structure of a water-soluble polysaccharide in *Stereocaulon paschale* (L.)Fr. *Acta Chemica Scandinavica* **25**(7): 2622-2628.
- Hidalgo, M., E. Fernandez, et al. (1994). Antioxidant activity of depsides and depsidones. *Phytochemistry* **37**(6): 1585-1587.
- Hidalgo, M. E., L. Bascunan, et al. (2005). Spectroscopic and photochemical properties of the lichen compound lobaric acid. *Photochemistry and Photobiology* **81**: 1447-1449.
- Hidalgo, M. E., E. Fernández, et al. (2002). Photophysical, photochemical, and thermodynamic properties of shikimic acid derivatives: calycin and rhizocarpic acid (lichens). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **66**(3): 213-217.
- Higuchi, M., Y. Miura, et al. (1993). Inhibition of tyrosinase activity by cultured lichen tissues and bionts. *Planta Medica* **59**(3): 253-255.
- Hirayama, T., F. Fujikawa, et al. (1976). On the constituents of the lichen in the genus *Menegazzia*. Menegazziaic acid, a new depsidone from *Menegazzia asahinae* (Yas. ex Zahlbr.) Sant. and *Menegazzia terebrata* (Hoffm.) Mass. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **24**(10): 2340-2344.
- Hofstetter, V., J. Miadlikowska, et al. (2007 ). Phylogenetic comparison of protein-coding versus ribosomal RNA-coding sequence data: a case study of the Lecanoromycetes (Ascomycota). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **44**(1): 412-426.
- Högnabba, F. (2006). Molecular phylogeny of the genus *Stereocaulon* (Stereocaulaceae, lichenized ascomycetes). *Mycological Research* **110**: 1080-1092.
- Honda, N. K., F. R. Pavan, et al. (2010). Antimycobacterial activity of lichen substances. *Phytomedicine* **17**(5): 328-332.
- Hu, Z.-M., Q. a. Zhou, et al. (2009). Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. *Journal of dermatological science* **55**( 3): 179–184.

- Huang, M.-R. (2008). Noteworthy species of *Stereocaulon* from China. *Mycosytema* **27**(1): 85-90.
- Huneck, S. (1972). Die sekundärstoffe einiger flechten. *Phytochemistry* **11**(4): 1493-1495.
- Huneck, S. (1974). Sekundärstoffe einiger *Stereocaulon*-Arten. *Phytochemistry* **13**(10): 2313-2314.
- Huneck, S. (2001). *New results on the chemistry of lichen substances. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. New York, Springer. **81**.
- Huneck, S. and G. Follman (1965). Über die inhaltstoffe von *Nephroma gyelnikii* (RAES)LAMB, *Byssocaulon niveum* MONT. und *Stereocaulon corticulatum* NYL. var.*procerum* LAMB. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **20b**(10): 1012-1013.
- Huneck, S. and G. Follmann (1966). Über die inhaltstoffe von *Stereocaulon antarcticum* WAIN., *Anaptychia neoleucomelaena* KUR. und *Tornabenia ephebea* (ACH.)KUR. *Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil B: Anorganische Chemie, Organische Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie* **21**(7): 714-715.
- Huneck, S. and G. Follmann (1967). Zur chemie chilenischer Flechten. XVII. Über die inhaltsstoffe von *Usnea pusilla* (RAES.)RAES, *Stereocaulon ramulosum* (SWANS.)RAEUSCH. und *Arthothelium pacificum*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, Teil B: Anorganische Chemie, Organische Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie* **22**(4): 461.
- Huneck, S., M. Sainsbury, et al. (1984). Ecological and chemical investigations of lichens from south Georgia and the maritime Antarctic. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **56**: 461-480.
- Huneck, S. and R. Tabacchi (1987).  $\psi$ -esters of depsidones with a lactole ring. *Phytochemistry* **26**( 4): 1131-1138.
- Huneck, S. and I. Yoshimura (1996). *Identification of lichen substances*. Verlag Berlin Heidelberg New York, Springer.
- Hupel, M. (2011). Radiations UV et composés photoprotecteurs : étude comparée chez deux végétaux marins, l'algue brune *Pelvetia canaliculata* et l'angiosperme *Salicornia ramosissima*.Academic departement. Brest.Universty.: 234.
- Hylands, P. J. and K. Ingolfssdottir (1985). The isolation of methyl- $\beta$ -orsellinate from *Stereocaulon alpinum* and comments on the isolation of 4,6-dihydroxy-2-methoxy-3-methylacetophenone from *Stereocaulon species*. *Phytochemistry* **24**(1): 127-129.
- Ingolfssdottir, K. (2002). Molecules of Interest Usnic acid. *Phytochemistry* **61**: 729-736.
- Ingolfssdottir, K., P. J. Hylands, et al. (1986). Structure of vesuvianic acid from *Stereocaulon species*. *Phytochemistry* **25**(2): 550-553.
- Jayaprakasha, G. K. and L. J. Rao (2000). Phenolics constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Zeitschrift für Naturforschung* **55c**: 1018-1022.
- Johnson, G. T. (1938). The taxonomic importance and phylogenetic significance of the cephalodia of *Stereocaulon*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **25**: 729-769.
- Jung, G., J. Yang, et al. (2001). Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. *Experimental and molecular medicine* **33**(3): 131-135.
- Karsten, U., T. Friedl, et al. (2005). Mycosporine-like amino acids and phylogenies in green algae : *Prasiola* and its relatives from the trebouxioophyceae (Chlorophyta). *Journal of Phycology* **41**: 557-566.
- Karsten, U., U. Karsten, et al. (2007). The effects of ultraviolet radiation on photosynthetic performance, growth and sunscreen compounds in aeroterrestrial biofilm algae isolated from building facades. *Planta* **225**: 991-1000.

- Kim, M. and H. Cho (2007). Melanogenesis inhibitory effects of methanolic extracts of *Umbilicaria esculenta* and *Usnea longissima*. *The Journal of Microbiology* **45**(6): 578-582.
- Kinoshita, Y. (1997). Inhibitors of melanin. *Fla-grance journal* **9**: 69-73.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, et al. (2001). *Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi*. Wallingford.
- König, G. M. and A. D. Wright (1999). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C-NMR and biological activity investigations of four lichen-derived compounds. *Phytochemical Analysis* **10**(5): 279-284.
- Krieger, E., T. Darden, et al. (2004). Making optimal use of empirical energy functions: Force-field parameterization in crystal space. *Proteins* **57**: 678-683.
- Kumar, S. and K. Müller (1999). Lichen metabolites. I. Inhibitory action against leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis by a non-redox mechanism. *Journal of Natural Products* **62**: 817-820.
- Kurokawa, S. and Y. Jinzenji (1965). Chemistry and nomenclature of Japanese *Anzia*. *Bulletin of the National Science Museum* **8**(3): 369-374.
- Lamb, M. (1951). On the morphology, phylogeny and taxonomy of the lichen genus *Stereocaulon*. *Canadian Journal of Botany* **29**: 522-584.
- Lamb, M. (1976). Structurally unusual types of cephalodia in the lichen *Stereocaulon* (subgen. *Holostelidium*). *The Journal of Japanese Botany* **51**(12): 1-7.
- Lamb, M. (1977). A conspectus of the lichen genus *Stereocaulon*. *Journal of the Hattori Botanical Laboratory* **43**: 191-355.
- Lavergne, R. (1989). Plantes médicinales indigènes tisanerie et tisaneurs de la Réunion. Académie département. Montpellier. Université. doctorat: 519-521.
- Leao, P., N. Engene, et al. (2012). The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Product Reports* **29**: 372-391.
- Li, B., Z. Lin, et al. (1991). The chemical constituents of four lichens from China. *Yunnan Zhiwu Yanjiu* **13**(1): 81-84.
- Li, G.-Y., B.-G. Li, et al. (2008). Secondary Metabolites from the Fungus *Chaetomium brasiliense*. *Helvetica Chimica Acta* **91**(1): 124-129.
- Lohézic-Le Dévéhat, F., B. Legouin, et al. (2010). 4<sup>èmes</sup> journées de l'AFERP " Biodiversité, chimie des substances naturelles et médicaments" et 3<sup>ème</sup> Symposium franco-pakistanaï. *Evaluation of a new UV-filter screening method*, Besançon (France).
- Lohézic - Le Dévéhat, F., S. Tomasi, et al. (2007). Stictic acid derivatives from the lichen *Usnea articulata* and their antioxidant activities. *Journal of Natural Products* **70**: 1218-1220.
- Lopes, T. I. B., R. G. Coelho, et al. (2008). Radical scavenging activity of orsellinates. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **56**(11): 1551-1554.
- Lücking, R., J. D. Lawrey, et al. (2009). Do lichens domesticate photobionts like farmers domesticate crops? Evidence from a previously unrecognized lineage of filamentous cyanobacteria. *American Journal of Botany* **96**(8): 1409-1418.
- Maass, W. S. G., G. H. N. Towers, et al. (1964). Flechtenstoffe: I. Untersuchungen zur Biogenese des Pulvinsaureanhydrids. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **77**: 157-161.
- Magnusson, A. (1926). Studies on boreal *Stereocaula*. *Kungliga Vetenskaps- och Vitterhets-Samhälles handlingar* **30**(7): 1-89.
- Magnusson, A. (1944). Hawaiian lichens. The families Lecideaceae to Parmeliaceae. *Arkiv for Botanik* **31**(6): 40-43.
- Malik, S. B., N. P. Pardeshi, et al. (1972). Chemical investigation of Indian lichens. Part XXX. *Indian Journal of Chemistry* **10**(10): 1040.

- Mansur, J. S., M. N. R. Breder, et al. (1986). Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia* **61**: 121-124.
- Marfak, A., P. Trouillas, et al. (2002). Radiolysis of quercetin in methanol solution: observation of depsides formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**(17): 4827-4833.
- Massart, J. (1901). Lichens recoltés à Java en 1894-1895 déterminés par M. l'Abbé Hue. *Annales du Jardin botanique de Buitenzorg* **2**(2): 171-175.
- Melo, M., J. Dos Santos, et al. (2011). Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicology in vitro* **25**: 462-468.
- Millot, M. (2008). Etude phytochimique de trois lichens crustacés du littoral breton : *Ochrolechia parella*, *Tephromela atra* et *Diploicia canescens*. Recherche d'une activité photoprotectrice. Académie départementale. Rennes. University.
- Millot, M., S. Tomasi, et al. (2008). Phytochemical investigation of *Tephromela atra*: NMR studies of collatolic acid derivatives. *Phytochemistry Letters* **1**(3): 139-143.
- Millot, M., S. Tomasi, et al. (2009). Cytotoxic Constituents of the Lichen *Diploicia canescens*. *Journal of Natural Products* **72**(12): 2177-2180.
- Mineta, M. (1984). Preliminary report on *Stereocaulon* of Papua New Guinea. *Bulletin of the National Science Museum* **10**(3): 133-142.
- Miyagawa, H., M. Yamashita, et al. (1997). Hypostrepsilalic acid from a cultured lichen mycobiont of *Stereocaulon japonicum*. *Phytochemistry* **46**(7): 1289-1291.
- Mollinedo, P., J. L. Vila, et al. (2003). Actividad antioxidante y fotoprotectora de metabolitos secundarios aislados de liquenes. *Revista Boliviana De Quimica* **20**(1): 21-27.
- Morita, H., T. Tsuchiya, et al. (2009). Antimitotic activity of lobaric acid and a new benzofuran, sakisacaulon A from *Stereocaulon sasakii*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **19**(13): 3679-3681.
- Mosbach, K. (1964). On the biosynthesis of lichen substances Part 2. The pulvic acid derivative vulpinic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **17**(4): 363-367.
- Nylander, J. (1860). *Synopsis methodica lichenum*. Paris.
- Nylander, J. A., F. Ronquist, et al. (2004). Bayesian phylogenetic analysis of combined data. *Systematic Biology* **53**(1): 47-67.
- Nylander, W. (1866). Lichenes quos S. Kurz legit in insula Java. *Flora* **49**: 129 - 135.
- Ohashi, H., T. Kyogoku, et al. (1999). Antioxidative activity of tree phenolic constituents 1: Radical-capturing reaction of flavon-3-ols with radical initiator. *Journal of Wood Science* **45**: 53-63.
- Parvez, S., M. Kang, et al. (2007). Naturally occurring tyrosinase inhibitors : mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. *Phytotherapy Research* **21**: 805-816.
- Pittayakhajonwut, P., A. Dramaee, et al. (2006). Depsidones from the endophytic fungus BCC 8616. *Journal of Natural Products* **69**(9): 1361-1363.
- PNUE (2008). PNUE 2007 Rapport Annuel.
- Rai, A. (1991). *CRC Handbook of symbiotic cyanobacteria*. Boca raton, CRC press.
- Rai, A., E. Soderback, et al. (2000). Cyanobacterium - plant symbioses. *New Phytologist* **147**: 449-481.
- Ramaut, J. L., E. Serusiaux, et al. (1978). Lichens acids of the *Stereocaulon ramulosum* group in central East Africa. *Bryologist* **81**(3): 415-421.
- Rana, N. M., M. V. Sargent, et al. (1975 ). Structure of the lichen depsidone variolaric acid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(19): 1992-1995.
- Raven, P. H., R. F. Evert, et al. (2000). Les champignons. *Biologie végétale*. I. D. B. Université. Paris, W. H. Freeman and Company: 334-338.

- René, A., M.-L. Abasq, et al. (2010). How Do Phenolic Compounds React toward Superoxide Ion? A Simple Electrochemical Method for Evaluating Antioxidant Capacity. *Analytical Chemistry* **82**(20): 8703-8710.
- Riddle, L. (1910). The North American Species of *Stereocaulon*. *Botanical gazette* **50**: 285-304.
- Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**(12): 1572-1574.
- Roullier, C., GN, M. Chollet-Krugler, et al. (2011). Characterization and identification of mycosporine-like compounds in cyanolichens. Isolation of mycosporine hydroxyglutamicol from *Nephroma laevigatum* Ach. *Phytochemistry* **72**(11-12): 1348-1357.
- Rukachaisirikul, V., W. Naklue, et al. (2006). Phloroglucinols, depsidones and xanthenes from the twigs of *Garcinia parvifolia*. *Tetrahedron* **62**(36): 8578-8585.
- Sala, T., M. V. Sargent, et al. (1981). Depsidone Synthesis. New Metabolites of the Lichen *Buellia canescens* (Dicks.) De Not: Novel Phthalide Catabolites of Depsidones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*: 849-854.
- Santesson, J. (1970). Some occurrences of the anthraquinone parietin in lichens. *Phytochemistry* **9**(7): 1565-1567.
- Schoch, C. L., K. A. Seifert, et al. (2012.). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(16): 6241-6246.
- Seo, C., J. H. Sohn, et al. (2009). Protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory effects of depsidone and pseudodepsidone metabolites from the antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **19**(10): 2801-2803.
- Shick, J. M., S. Romaine-Lioud, et al. (1999). Ultraviolet-B radiation stimulates shikimate pathway-dependent accumulation of mycosporine-like amino acids in the coral *Stylophora pistillata* despite decreases in its population of symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* **44**: 1667-1682.
- Singh, S., R. Rastogi, et al. (2008). Mycosporine-like amino-acids (MAAs): chemical structure, biosynthesis and significance as UV-absorbing/screening compounds. *Indian Journal of experimental Biology* **46**: 7-17.
- Solberg, Y. (1977). Chemical investigation of the lichen species *Alectoria ochroleuca*, *Stereocaulon vesuvianum* var. *pulvinatum* and *Icmadophila ericetorum*. *Zeitschrift fuer Naturforschung, C: Journal of Biosciences* **32C**(3-4): 182-189.
- Stocker-Wörgötter, E. (2008). Metabolic diversity of lichen-forming ascomycetous fungi: culturing, polyketide and shikimate metabolite production, and PKS genes. *Natural Product Reports* **25**(1): 188-200.
- Suwarso, W. P., R. L. Gani, et al. (1999). Dasypogalactone, a new C3-symmetric macrolactone from the Indonesian lichen *Usnea dasypoga*. *European Journal of Organic Chemistry* **7**: 1719-1721.
- Taguchi, H., U. Sankawa, et al. (1969). Biosynthesis of natural products. VI. Biosynthesis of usnic acid in lichens. A general scheme of biosynthesis of usnic acid. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **17**(10): 2054-2060.
- Takahashi, K., T. Kon, et al. (1981). Chemotaxonomic studies on the polysaccharides of lichens. Polysaccharides of stereocaulaceous lichens. *Carbohydrate Research* **89**(1): 166-173.
- Toledo Marante, F., A. Garcia Castellano, et al. (2003). Identification and quantitation of allelochemicals from the lichen *Lethariella canariensis* : Phytotoxicity and antioxidative activity. *Journal of Chemical Ecology* **29**(9): 2049-2071.

- Valencia-Islas, N., A. Zambrano, et al. (2007). Ozone reactivity and free radical scavenging behavior of phenolic secondary metabolites in lichen exposed to chronic oxidant air pollution from Mexico city. *Journal of Chemical Ecology* **33**: 1619-1634.
- Van-der-Spoel, D., E. Lindahl, et al. (2005). GROMACS: Fast, flexible, and free. *Journal of Computational Chemistry* **26**(16): 1701-1718.
- Van-Haluwyn, C., J. Asta, et al. (2009). *Guide des lichens de France : lichens des arbres*. Paris.
- Vila, J., P. Canaviri Paz, et al. (2004). Stictic acid and atranorin from the lichen *Stereocaulon tomentosum* Fr. *Revista Boliviana de Quimica* **21**(1): 76-79.
- Vila, J., P. Mollinedo, et al. (2008). 1,3,7-trimethylguanine from the lichen *Stereocaulon ramulosum*. *Revista Boliviana de Quimica* **25**(1): 1-3.
- Wahyuono, S. and Subagus (1994). Quantitative assay of the main substance present in the kayu angin [*Usnea misaminensis* (Vaion.) Not., fam. Usneaceae] collected from Jamu Industries and local market by densitometry. *Majalah Farmasi Indonesia* **5**(2): 59-68.
- Wahyuono, S., Sudarsono, et al. (1995). The purity test of the major compound isolated from the green and yellow Kayu angin (*Usnea* sp.). *Majalah Farmasi Indonesia* **6**(1): 1-7.
- White, T. J., T. Bruns, et al. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White. New York,, Academic Press, Inc: 315–322.
- Wolseley, P. A., B. Aguirre-Hudson, et al. (2002). Catalogue of the lichens of Thailand. *Bulletin of the Natural History Museum (Botany)* **32**(1): 13 - 59.
- Yokota, I. and S. Shibata (1978). A polysaccharide of the lichen, *Stereocaulon japonicum*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **26**(9): 2668-2670.
- Yokota, I., S. Shibata, et al. (1979). A <sup>13</sup>C-NMR analysis of linkages in lichen polysaccharides : an approach to chemical taxonomy of lichens. *Carbohydrate Research* **69**(1): 252-258.
- Zahlbruckner, A. (1934). Die von der Deutschen Limnologischen Sunda-Expedition gesammelten Flechten. *Archiv für Hydrobiologie - Supplement Bd* **12**: 730 - 738.
- Zahlbruckner, A. (1956). Flechtenflora von Java. 2. Teil. [ergänzt und herausgegeben von F. Mattick]. *Willdenowia, Mitteilurfggen aus dem Botanischen Garten und Museum Berlin-Dahlem* **1**(3): 433 - 528.
- Zharkikh, A. (1994). Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **39**: 315-329.

## **ANNEXES**





## Annexe 1. Liste des espèces de lichens prélevés en Indonésie

Tableau 23. Liste des espèces de lichens prélevés en Indonésie

Famille/Genre/Espèce	Lieu	rapporté par
Baeomycetaceae/ <i>Baeomyces</i> Cladoniaceae/ <i>cladonia</i> Stereocaulaceae/ <i>S.nesaeum</i> Nyl. et <i>S.turgescens</i> Nyl. Parmeliaceae/ <i>usnea</i> Ramalinaceae/ <i>ramalina</i> et <i>platysma</i> Lobariaceae / <i>sticta</i> Physciaceae/ <i>physcia</i> et <i>pyxine</i> Pannariaceae / <i>pannaria</i> Coccocarpiaceae / <i>coccocarpia</i> Lecanotaceae / <i>lecanora</i> Pertusariaceae / <i>pertusaria</i> Lecideaceae / <i>lecidea</i> Graphidaceae/ <i>graphis</i> Roccellaceae / <i>opegrapha</i> et <i>chiodecton</i> Melaspileaceae / <i>melaspilea</i> Graphidaceae/ <i>glyphis</i> Verrucariaceae/ <i>verrucaria</i> Trypetheliaceae/ <i>trypethelium</i>	L'ouest Java (Mont Pangrango et Bogor)	(Nylander 1866)
<i>Stereocaulon</i> : <i>S. graminosum</i> <i>S. myriocarpoides</i> <i>S. nesaeum</i> <i>S. confluens</i> <i>S. massartianum</i> <i>S. verruculiferum</i> <i>S. arbuscula</i> <i>S. albicans</i> <i>S. botryosum</i> <i>S. condensatum</i> <i>S. japonicum</i> <i>S. proximum</i> <i>S. quisquiliare</i> <i>S. ramulosum</i>	Ouest de Java : Tangkuban perahu, Mont Salak, Mont Gede, Mont Pangrango	(Zahlbruckner 1956)
<b><i>Phaeographina maxima</i> Groenhart</b>	Solok, L'ouest Sumatra	(Groenhart 1958)

<i>Umbilicaria zollingeri</i> Groenhart <i>Mycoblastus endoxanthus</i> Groenhart <i>Cyanoporina granulosa</i> Groenhart <i>Staurothele australis</i> Groenhartart <i>Migroglæna javanica</i> Groenhartart <i>Microglæna marginata</i> Groenhart <i>Porina isidiosa</i> Groenhart <i>Opegrapha aggregata</i> Groenhart <i>Graphis psidii</i> Groenhart <i>Phaeographis ramulicola</i> Groenhart <i>Lecanactis albida</i> Groenhart <i>Diploschistes centrifigus</i> Groenhart <i>Ionaspis badia</i> Groenhart <i>Gyalecta recedens</i> Groenhart <i>Gyalecta misera</i> Groenhart <i>Heppia pulchra</i> Groenhart <i>Heppia scrabra</i> Groenhart <i>Lecidea pertusariodes</i> Groenhart <i>Mycoblastus grisomagrinateus</i> Groenhart <i>Megalospora flavidula</i> Groenhart <i>Bacidia modesta</i> Groenhart <i>Bacidia elegantula</i> Groenhart <i>Bacidia aspera</i> Groenhart <i>Bacidia avellanea</i> Groenhart <i>Bacidia solediosa</i> Groenhart <i>Thelocarpon algicola</i> Groenhart <i>Acarospora confuse</i> Groenhart <i>Blastenia olivacea</i> Groenhart <i>Buellia dissipata</i> Groenhart <i>Tysanothecium casuarinarum</i> Groenhart	Est de Java (Malang, Mont Ardjuno) Ouest de Java (Mont Pangrango, Cibodas, Mont Gede, Mont gegerbentang)	(Groenhart 1950)  (Groenhart 1951) (Groenhart 1954)
<i>Verrucaria morosa</i> <i>Staurothele malayensis</i> <i>Porina ulceratula</i> <i>Ionapsis sumatrana</i> <i>Bacidia herrmannii</i> <i>Cladonia:</i> <i>C. aggregata</i> , <i>C. furcata</i> var. <i>corymbosa</i> <i>C. didyma</i> var. <i>polydactyloides</i> <i>C. didyma</i> var. <i>vulcanica</i> <i>C. fimbriata</i> var. <i>bobonica</i> <i>C. medusina</i> var. <i>dealbata</i> .	Sud de Sumatra Sud de Sumatra Sumatra Sumatra Sumatra  Sumatra	(Zahlbruckner 1934)

\*Les espèces en gras sont les espèces décrites pour la première fois

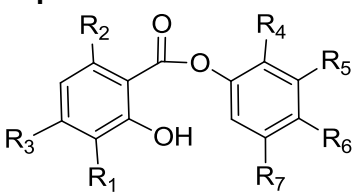
## Annexe 2. Liste des 11 herbiers en Indonésie

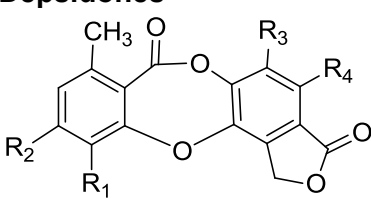
**Tableau 24. Liste des 11 herbiers en Indonésie ([http://sweetgum.nybg.org/ih/herbarium\\_list.php](http://sweetgum.nybg.org/ih/herbarium_list.php))**

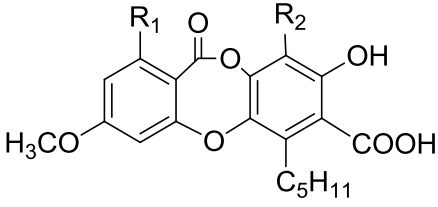
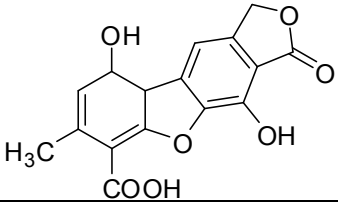
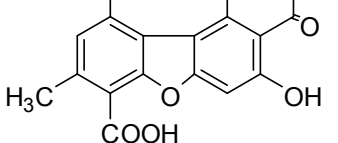
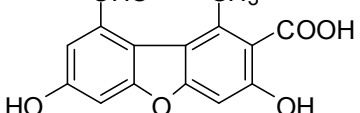
Code d'Herbiers	Institution	Emplacement
ANDA	Université d'Andalas	Padang, Ouest Sumatra
BIOT	Centre régional de biologie tropicale	Bogor, Ouest Java
BO	Herbier Bogoriense	Cibinong, Ouest Java
BZ	Herbier Bogoriense	Bogor, Ouest Java
BZF	De recherche forestière Centre de développement et et protection de la nature	Bogor, Ouest Java
CEB	Université de Tadulako	Palu, Centre Sulawesi
FIPIA	Institute Technologie de Bandung	Bandung, Ouest Java
KRB	Jardin botanique de Bogor	Bogor, Ouest Java
MAN	Université de Papouasie	Manokwari, Irian Jaya
PAS	Station sucre expérimentale de Java	Pasuruan, Est Java
WAN	Station de recherche forestière	Wanariset Samboja, Est Kalimantan

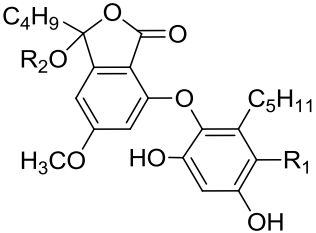
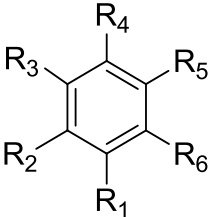
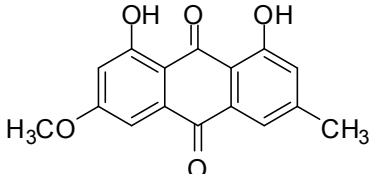
### Annexe 3. Bibliographie du genre Stereocaulon

Tableau 25. Les composés lichéniques extraits du genre Stéréocaulon

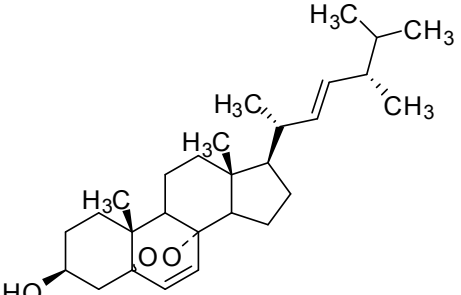
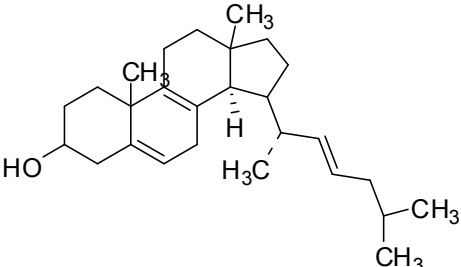
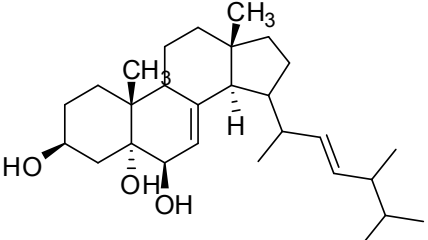
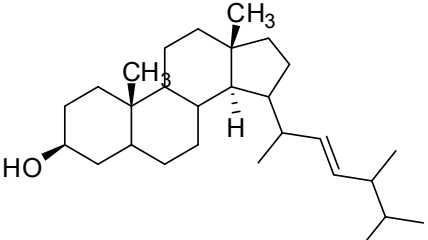
Type Moléculaire	Composés	Espèce de Stereocaulon et references
<b>Depsides</b> 	<b>atranorine</b> $R_1 = \text{CHO}$ , $R_2 = \text{CH}_3$ , $R_3 = \text{OH}$ , $R_4 = \text{CH}_3$ , $R_5 = \text{COOCH}_3$ , $R_6 = \text{OH}$ , $R_7 = \text{CH}_3$	<i>S.alpinum</i> (Seo, Sohn et al. 2009) <i>S.incrustatum</i> , <i>S.massartianum</i> <i>S.sorediiferum</i> (Huang 2008) <i>S.tomentosum</i> (Vila, Canaviri Paz et al. 2004) <i>S.vesuvianum</i> (Bolognese, Chioccare et al. 1974) <i>S.azoreum</i> , (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992) <i>S.ramulosum</i> (Cambie 1968) <i>S.meyeri</i> , <i>S.ramulosum</i> (Ramaut, Serusiaux et al. 1978) <i>S.strictum</i> , <i>S. strictum var compressum</i> , <i>S.argus</i> , <i>S.myriocarpum</i> <i>S.subcorraloides</i> <i>S.tomentosum compactum</i> (Huneck 1974) <i>S.vesuvianum</i> (Konig and Wright 1999) <i>S.implexum</i> , <i>S.spathuliferum f. pygmaeum</i> , <i>S.sterile</i> (Huneck 1972) <i>S.ramulosum</i> (Huneck and Follmann 1967) <i>S.corticatulum</i> , <i>S.ramulosum</i> (Fox and Huneck 1970) <i>S.ramulosum</i> , <i>S.nanodes</i> <i>S.antarcticum</i> (Huneck and Follmann 1966) <i>S.exutum</i> (Kurokawa and Jinzenji 1965) <i>S.corticulatum var, procerum</i> (Huneck and Follman 1965) <i>S.foliosum</i> , <i>S.myrocarpum</i> (Aghoramurthy, Sarma et al. 1961) <i>S.curtatum</i> (Hamada and Ueno 1990) <i>S.piluliferum</i> (Malik, Pardeshi et al. 1972) <i>S.ramulosum</i> (Vila, Mollinedo et al. 2008)
	<b>acide lécanorique</b> $R_1 = \text{H}$ , $R_2 = \text{CH}_3$ , $R_3 = \text{OH}$ , $R_4 = \text{OH}$ , $R_5 = \text{COOH}$ , $R_6 = \text{CH}_3$ , $R_7 = \text{H}$	<i>S.curtatum</i> (Hamada and Ueno 1990) <i>S.corticulatum var. procerum</i> (Huneck and Follman 1965)
	<b>acide miriquidique</b>	<i>S.curtatum</i> (Hamada and Ueno 1990)

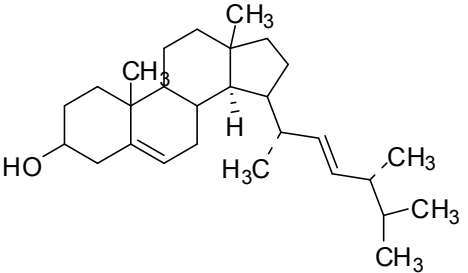
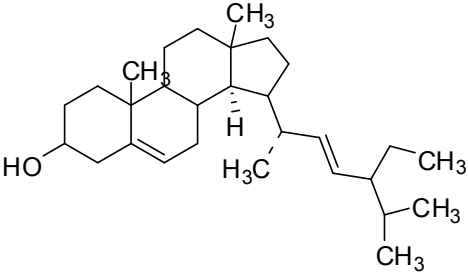
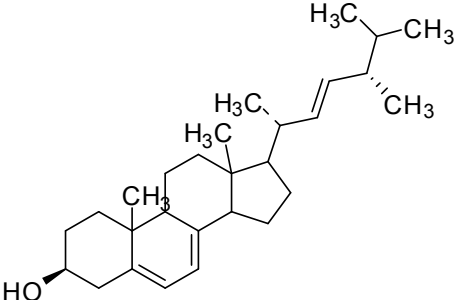
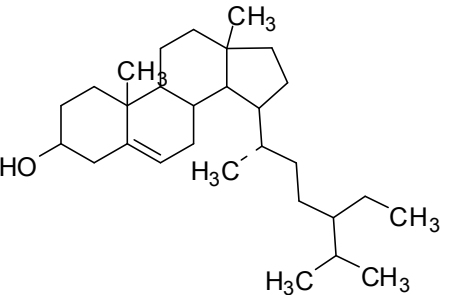
	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> COC <sub>2</sub> H <sub>5</sub> , R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = OH, R <sub>5</sub> = COOH, R <sub>6</sub> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> , R <sub>7</sub> = H	
	<b>acide perlatolique</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> , R <sub>3</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = OH, R <sub>5</sub> = COOH, R <sub>6</sub> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> , R <sub>7</sub> = H	<i>S.ramulosum</i> (Vila, Mollinedo et al. 2008) <i>S.meyeri</i> (Fox and Huneck 1970)
	<b>acide anziaique</b> R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> , R <sub>3</sub> = OH, R <sub>4</sub> = OH, R <sub>5</sub> = COOH, R <sub>6</sub> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> , R <sub>7</sub> = H	<i>S.ramulosum</i> (Vila, Mollinedo et al. 2008)
<b>Depsidones</b> 	<b>acide cryptostictique</b> R <sub>1</sub> = CH <sub>2</sub> OH, R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> = CH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = OH	<i>S.azoreum</i> (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992)
	<b>acide stictique</b> R <sub>1</sub> = CHO, R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> = CH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = OH	<i>S.tomentosum</i> (Vila, Canaviri Paz et al. 2004) <i>S.azoreum</i> , (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992) <i>S.meyeri</i> (Ramaut, Serusiaux et al. 1978) <i>S.strictum</i> , (Huneck 1974) <i>S.tomentosum var.compactum</i> , (Huneck 1972) <i>S.cornutum</i> (Fox and Huneck 1970) <i>S.foliosum</i> , <i>S.myriocarpum</i> (Aghoramurthy, Sarma et al. 1961) <i>S.piluliferum</i> (Malik, Pardeshi et al. 1972)
	<b>acide constictique</b> R <sub>1</sub> = CHO, R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> = CH <sub>2</sub> OH, R <sub>4</sub> = OH	<i>S.vesuvianum var.pulvinatum</i> (Solberg 1977)
	<b>acide vésuvianique</b> R <sub>1</sub> = CHO, R <sub>2</sub> = OCH <sub>3</sub> , R <sub>3</sub> = CH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = OC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	<i>S.vesuvianum var.pulvinatum</i> (Ingolfssdottir, Hylands et al. 1986) <i>S.alpinum</i> (Solberg 1977)
	<b>acide norstictique</b> R <sub>1</sub> = CHO, R <sub>2</sub> = OH, R <sub>3</sub> = CH <sub>3</sub> , R <sub>4</sub> = OH	<i>S.meyeri</i> , (Ramaut, Serusiaux et al. 1978) <i>S.argus</i> , (Huneck 1974) <i>S.spathuliferum f. pygmaeum</i> (Huneck 1972)
	<b>acide colensoïque</b> R <sub>1</sub> = C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> , R <sub>2</sub> = H	<i>S.colensoi</i> (Fox, Klein et al. 1970)

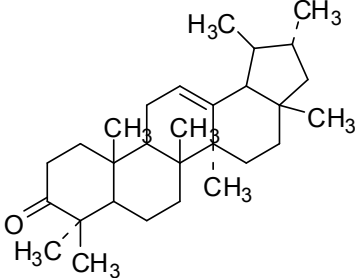
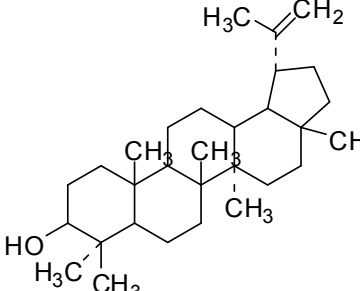
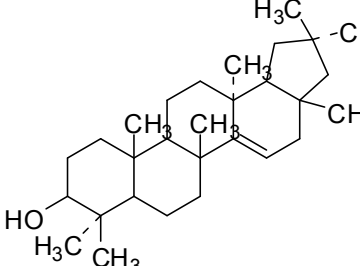
	<p><b>acide lobarique</b>  <math>R_1 = \text{COC}_4\text{H}_9</math>, <math>R_2 = \text{CH}_3</math></p>	<p><i>S.alpinum</i> (Seo, Sohn et al. 2009)  <i>S.azoreum</i> (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992)  <i>S.subcorraloides</i>, (Huneck 1974)  <i>S.implexum</i> <i>S.sterile</i> (Huneck 1972)  <i>S.antarcticum</i> (Huneck and Follmann 1966)  <i>S.exutum</i> (Kurokawa and Jinzenji 1965)  <i>S.sasakii</i> (Morita, Tsuchiya et al. 2009)  <i>S.glabrum</i> (Huneck, Sainsbury et al. 1984)</p>
<p><b>Dibenzofuranes</b></p> 	<p><b>strepsiline</b></p>	<p><i>S.azoreum</i> (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992)</p>
	<p><b>acid porphyrique</b></p>	<p><i>S.strictum</i>, <i>S. strictum var compressum</i> (Huneck 1974)</p>
	<p><b>acide hypostrepsilalique (culture de spore)</b></p>	<p><i>S.japonicum</i> (Miyagawa, Yamashita et al. 1997)</p>
<p><b>Diphényl ether</b></p>	<p><b>sakisacaulon A</b>  <math>R_1 = \text{H}</math>, <math>R_2 = \text{H}</math></p>	<p><i>S.sasakii</i> (Morita, Tsuchiya et al. 2009)</p>
	<p><b>pseudodepsidone 2</b>  <math>R_1 = \text{H}</math>, <math>R_2 = \text{CH}_3</math></p>	<p><i>S.alpinum</i> (Seo, Sohn et al. 2009)</p>

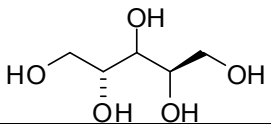
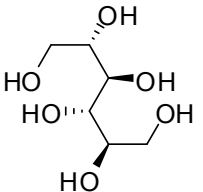
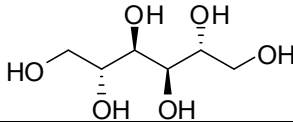
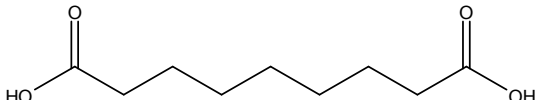
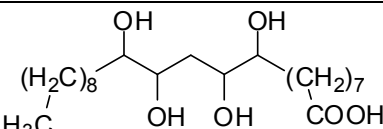
	<p><b>pseudodepsidone 3</b> R<sub>1</sub>=COOH, R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub></p>	<p><i>S.alpinum</i> (Seo, Sohn et al. 2009)</p>
<p><b>Composés monoaromatiques phénoliques</b></p> 	<p><b>Haematommate d'éthyle</b> R<sub>1</sub>= CHO, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>= COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>= OH</p>	<p><i>S.pomiferum</i>, (Li, Lin et al. 1991) <i>S.paschale</i> (Cai, Song et al. 2009)</p>
	<p><b>β-orsellinate de méthyle</b> R<sub>1</sub>= COOCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= OH, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= CH<sub>3</sub></p>	<p><i>S.ramulosum</i>, <i>S.azoreum</i>, (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992) <i>S.alpinum</i> (Seo, Sohn et al. 2009)</p>
	<p><b>Atranol</b> R<sub>1</sub>= CHO, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= OH</p>	<p><i>S.azoreum</i>, (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992) <i>S.vesuvianum</i> (Caccamese, Compagnini et al. 1986)</p>
	<p><b>4,6-dihydroxy,2-méthoxy-3-méthylacétophénone</b> R<sub>1</sub>= COCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>= OH, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= OH</p>	<p><i>S.vesuvianum</i> (Bolognese, Chioccare et al. 1974) <i>S.alpinum</i> (Hylands and Ingolfssdottir 1985)</p>
	<p><b>orcinol carboxylate de méthyle</b> R<sub>1</sub>= COOCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>= OH, R<sub>5</sub>= H, R<sub>6</sub>= CH<sub>3</sub></p>	<p><i>S.ramulosum</i> (Vila, Mollinedo et al. 2008) <i>S.curtatum</i> (Hamada and Ueno 1990) <i>S.vesuvianum</i> (Caccamese, Compagnini et al. 1986)</p>
	<p><b>Haematommate de méthyle</b> R<sub>1</sub>= CHO, R<sub>2</sub>= OH, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>5</sub>= COOCH<sub>3</sub>, R<sub>6</sub>= OH</p>	<p><i>S. alpinum</i> (Seo, Sohn et al. 2009)</p>
<p><b>Antraquinone</b></p> 	<p><b>Pariétine</b></p>	<p><i>S.graminosum</i> (Aghoramurthy, Sarma et al. 1961) <i>S.corticulatum</i> var. <i>procerum</i> (Santesson 1970)</p>
<p><b>Stéroïdes</b></p>	<p><b>péroxyde d'ergostérol</b></p>	<p><i>S.azoreum</i> (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992)</p>

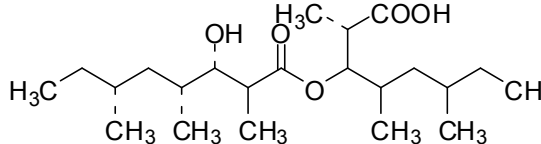
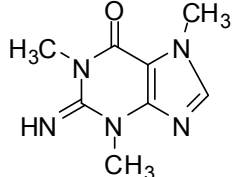


		
	<b>lichestérol</b>	<i>S.tomentosum</i> (Solberg 1977)
	<b>cérévistérol</b>	<i>S.azoreum</i> (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992)
	<b>brassicastérol</b>	<i>S.azoreum</i> (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992) <i>S.tomentosum</i> (Bruun 1976)

	<b>dihydro-ergostérol</b>	<i>S.tomentosum</i> (Solberg 1977)
	<b>stigmasterol</b>	<i>S.tomentosum</i> (Solberg 1977)
	<b>ergostérol</b>	<i>S.tomentosum</i> (Solberg 1977)
	<b>β-sitostérol</b>	<i>S.antarcticum</i> (Huneck and Follmann 1966)
<b>Triterpénoïdes</b>	<b>α-amyrine</b>	<i>S.azoreum</i> (Solberg 1977; Gonzalez, Rodriguez Perez)

		et al. 1992)
	<b>lupéol</b>	<i>S.azoreum</i> (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992) <i>S.tomentosum</i> (Solberg 1977)
	<b>taraxérol</b>	<i>S.azoreum</i> (Gonzalez, Rodriguez Perez et al. 1992)
<b>composés aliphatiques</b>		
<b>Caroténoïde</b>	<b>β-carotène, lycoxanthine, canthaxanthine, lutéine,époxyde de lutéine, zéaxanthine, adonixanthine, astaxanthine, mutatochrome, mutatoxanthine</b>	<i>S.alpinum</i> (Czeczuga 1986)
<b>Polyols</b>	<b>D-arabitol</b>	<i>S.colensoi</i> (Fox, Klein et al. 1970) <i>S.myriocarpum</i> var. <i>orizabae</i> , <i>S.foliosum</i> (Aghoramurthy, Sarma et al. 1961)

		<i>S.piluliferum</i> (Malik, Pardeshi et al. 1972)
	<b>galactitol</b>	<i>S.ramulosum</i> (Vila, Mollinedo et al. 2008)
	<b>mannitol</b>	<i>S.colensoi</i> (Fox, Klein et al. 1970)
<b>Polysaccharides</b>	<b>galactomannane B Heteroglycane</b>	<i>S.ramulosum</i> (Baron, Gorin et al. 1988; Baron, Gorin et al. 1989) <i>S.paschale</i> (Hauan and Kjoelberg 1971; Gorin and Iacomini 1985) <i>S.species</i> (Takahashi, Kon et al. 1981) <i>S.japonicum</i> (Yokota and Shibata 1978; Yokota, Shibata et al. 1979)
<b>Acides gras</b> C16 :0, C18 :0, C18 :1, C18 :2, C18 :3	<b>acides gras saturés et insaturés</b>	<i>S.colensoi</i> (Fox, Klein et al. 1970) <i>S. vesuvianum</i> (Solberg 1977) <i>S.ramulosum</i> (Fox and Huneck 1970)
2-OH-C24:0	<b>acides gras 2-hydroxyle</b>	<i>S.tomentosum</i> (Solberg 1977)
	<b>acides dicarboxyliques</b>	<i>S.tomentosum</i> (Solberg 1977)
	<b>acide ventosique</b>	<i>S.myriocarpum</i> (Aghoramurthy, Sarma et al. 1961)

 <p>Chemical structure of 2-methyl-2-propyl-3-hydroxy-3-methylbutanoic acid ester. The structure shows a central carbon atom bonded to a methyl group (H<sub>3</sub>C), a propyl group (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), a hydroxyl group (OH), and a methyl group (CH<sub>3</sub>). This central carbon is also bonded to a carbonyl group (C=O) which is part of an ester linkage to a 2-methyl-2-propylbutanoic acid moiety.</p>	<b>acide bourgeanique</b>	<i>S.tomentosum</i> (Bruun 1973)
<b>Autre</b>  <p>Chemical structure of 1,3,7-trimethylxanthine (theophylline). It is a purine derivative with methyl groups attached to the nitrogen atoms at positions 1, 3, and 7.</p>	<b>1,3,7-triméthylguanine</b>	<i>S.ramulosum</i> (Vila, Mollinedo et al. 2008)

## Annexe 4. La classification du genre *Stereocaulon*

Plusieurs classifications du genre *Stereocaulon* ont été élaborées de 1943-1977 et nous avons retenu celle de Lamb et de Duvigneaud qui sont les plus abouties. Les précédents auteurs comme Riddle, Nylander avaient surtout décrit certaines espèces et émis des constatations qui ont permis à Duvigneaud et Lamb de peaufiner leurs clés. Nous avons simplifié les clés de détermination élaborées par ces 2 auteurs.

### **Classification simplifiée de Duvigneaud, 1943**

**Sous-genre *Platycladium*** : apothécies lécidéoïdes, hyménium étroit, spores courtes, cloisons peu nombreuses

**Section *Eustereocaulon*** : squamules dorsi-ventrales qui se sont ensuite allongées en pseudopodétions avec des apothécies plus hautes que des squamules (= phylloclades), céphalodies simples, moriformes sans cortex, apothécie simple, amphithécium peu différencié et grumeleux, spores courtes et généralement triseptées

**Sous-section *umbilicata*** : phylloclades ombiliquées, petites apothécies

**Sous-section *granulata*** : phylloclades non ombiliquées, grandes apothécies

**Section *Botryoideum*** : phylloclades devenant radiaires (avec section qui augmente et s'arrondit), cortex à la face supérieure dorsale, spores avec septa qui augmentent de 3-7, céphalodies botryoïdes)

**Sous-genre *Cylindrocladium*** : phylloclades avec structure radiaire, céphalodies plicato-scrobiculée, ficoïde, hyménium large, spores allongées parfois filiforme, cloisons entre 7-15.

**Section *Corynophoron*** : spores triseptées, céphalodies ficoïdes

**Section *Lecanocaulon*** : apothécies lécanoroïdes, amphithécium plissé, spores courtes, vermiculaires

**Section : *Rhopalophoron*** : apothécies lécidéoïdes, spores longues vermiculaires, 15-voire plus septées

**Section *Lobophoron*** : céphalodies fissuro-lobulées, phylloclades dorsi-ventrales ramuleuses

### **Classification simplifiée de Lamb, 1951**

**Sous-genre *Enteropodium*** : possède des pseudopodétions naissant du thalle primaire avec des phylloclades vraies similaires au thalle primaire, céphalodies sphériques

**Section *Chondrocaulon*** : thalle lépreux

**Section *Eustereocaulon*** : phylloclades à centre foncé

**Section *Stereocladium*** : squamules dressés, flabello-spathulé, thalle primaire persistant

**Section *Leucocheilon*** : phylloclades ombiliquées à centre foncé

**Sous-genre *Holostelidium*** : possède des ramules phyllocladioïdes et pas de phylloclades vraies

**Section *Redingeria*** : pseudopodétions simples sans ramules phyllocladioïdes, céphalodies sacculées

**Section *Pilophoris*** : pseudopodétions peu rameux, céphalodies botryoïdes

**Section *Botryoideum*** : pseudopodétion rameux, ramules phyllocladioïdes nombreux bien développés, céphalodies sacculées

**Subsection *Aciculisporae*** : spores fusiformes, cylindriques, 3-7 septées

**Subsection *Ascaridisporeae*** : spores vermiformes, 8-30 septées

**Section *Dactyloideum*** : céphalodies digitato-lobées

**Section *Ecephalodia*** : pas de céphalodies

NB : phylloclades vraies = phylloclades dorsi-ventrales ; Ramules phyllocladioïdes = phylloclades radiaires c'est-à-dire branches latérales à développement disharmonique

### **Classification de Duvigneaud, 1956**

**Sous-genre *Enteropodium*** : phylloclades dorsiventrales, spores de 20-40 µm de long, à 1-3-5-7 septa, hyménium de 40-100 µm, céphalodies moriformes

**Section *Eustereocaulon*** :

**Série *granulata*** : apothécies de 0.6-1.5 mm de diamètre ; ils distinguent ensuite les espèces à thalle court de 1-3 cm et thalle de 4-9 cm

**Série *umbilicata*** : apothécies de 0.3-0.7 mm de diamètre

**Section *Stereocladium*** (idém à 1943)

**Section *Botryoideum*** (idém à 1943)

**Sous-genre *Lecanocaulon*** : phylloclades radiaires, apothécies lécanoroïdes, hyménium de 70-200 µm, spores longues fusiformes, 40-150 µm de long et 3-7 septées

(=section *sacculata* subsection *Aciculisporae*)

**Sous-genre *Rhopalophoron*** : phylloclades radiaires, hyménium de 200 µm, spores longues, vermiculiformes de 75-180 µm et 7-15-29 septa. (=section *sacculata* subsection *Ascaridisporeae*)

**Série *protoclavulifera*** : clavules (qui vont donner les apothécies > 0.2-0.4 mm)

**Série *euclavulifera*** : clavules (qui vont donner les apothécies 0.7-1 mm)

**Sous-genre *Lobophoron*** : phylloclades radiaires, pseudopodétion rameux, apothécie lécidéine, hymenium jusqu'à 150 µm, spores longues, filiformes, multiseptées, céphalodies diverses.

= type intermédiaire entre céphalodies évoluées et structure dorsi-ventrale

### **Classification de Lamb, 1977**

**Sous-genre I : *Stereocaulon*** (fusion de *Enteropodium* et *Eustereocaulon*)

**Section 1. *Stereocaulon***

**Section 2. *Stereocladium***

**Section 3. *Denudata***

**Sous-section A. *Denudata***

**Sous-section B. *Phyllocaulon***

**Sous-section C. *Botryoideum***

**Section 4. *Lobophoron***

**Sous-genre II : *Pilophoropsis***

**Sous-genre III. *Holostelidium***

**Section 1. *Holostelidium***

**Sous-section A. *Holostelidium***

**Sous-section B. *Aciculisporae***

**Sous-section C. *Dactyloideum***

**Section 2. *Redingeria***



Tableau 26. Classifications des *Stereocaulon* selon Lamb et Duvigneaud

Classification de Lamb, 1977	Classification de Duvigneaud, 1956
<p><b>Sous-genre I : <i>Stereocaulon</i></b> (fusion de Enteropodium et Eustereocaulon)</p> <p><b>Section 1. <i>Stereocaulon</i></b></p> <p><i>S. dactylophyllum, S. evolutum, S. grande</i></p> <p><b>Section 2. <i>Stereocladium</i></b></p> <p><b>Section 3. <i>Denudata</i></b></p> <p><b>Sous-section A. <i>Denudata</i></b></p> <p><i>S. vesuvianum, S. graminosum, S. scutelligerum, S. vulcani</i></p> <p><b>Sous-section B. <i>Phyllocaulon</i></b></p> <p><b>Sous-section C. <i>Botryoideum</i></b></p> <p><b>Section 4. <i>Lobophoron</i></b></p> <p><b>Sous-genre II : <i>Pilophoropsis</i></b></p> <p><b>Sous-genre III. <i>Holostelidium</i></b></p> <p><b>Section 1. <i>Holostelidium</i></b></p> <p><b>Sous-section A. <i>Holostelidium</i></b></p> <p><i>S. montagneanum</i></p> <p><b>Sous-section B. <i>Aciculisporae</i></b></p> <p><i>S. halei</i></p> <p><b>Sous-section C. <i>Dactyloideum</i></b></p> <p><b>Section 2. <i>Redingeria</i></b></p>	<p><b>Sous-genre <i>Enteropodium</i></b></p> <p><b>Section Eustereocaulon :</b></p> <p><b>Série <i>Granulata</i></b></p> <p><i>S. dactylophyllum, S. evolutum, S. grande, S. graminosum</i></p> <p><b>Série <i>Umbilicata</i></b></p> <p><i>S. vesuvianum, S. scutelligerum, S. vulcani</i></p> <p><b>Section Stereocladium</b></p> <p><b>Section Botryoideum</b></p> <p><b>Sous-genre <i>Lecanocaulon</i></b></p> <p><i>S. halei</i></p> <p><b>Sous-genre <i>Rhopalophoron</i></b></p> <p><b>Série <i>protoclavulifera</i></b></p> <p><i>S. montagneanum</i></p> <p><b>Série <i>euclavulifera</i></b></p> <p><b>Sous-genre <i>Lobophoron</i></b></p>